

BAZI LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN FİZYOLOJİK, BİYOKİMYASAL, PLAZMİT DNA VE PROTEİN PROFİL ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ*

Zehra Nur Yüksekdağ**, Yavuz Beyatlı

Gazi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Teknikokullar, Ankara

Geliş tarihi /Received: 21.09.2007

Düzeltilerek geliş tarihi /Received in revised form: 21.02.2008

Kabul tarihi /Accepted: 27.02.2008

Özet

Bu çalışmada, toplam 36 adet laktik asit bakterisi kefir, beyaz peynir, kaşar peyniri ve sucuktan izole edilmiştir. İzole edilen kültürler biyokimyasal testler ve API 50 CH kiti ile tanımlanmış ve toplam protein profilleri Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE) ile belirlenmiştir. Tanımlama testleri sonucunda 36 adet laktik asit bakterisi, *Leuconostoc cremoris* (1 suş), *Leu. mesenteroides* (1 suş), *Lactobacillus brevis* (1 suş), *Lb. casei* (2 suş), *Lb. lactis* (2 suş), *Lb. plantarum* (2 suş), *Lb. helveticus* (3 suş), *Lactococcus cremoris* (3 suş), *Lac. lactis* (3 suş), *Streptococcus durans* (1 suş), *Strep. thermophilus* (2 suş), *Pediococcus acidilactici* (2 suş), *P. pentosaceus* (4 suş) ve *P. dextrinicus* (9 suş) olarak tanımlanmıştır. 36 adet laktik asit bakteri suşunun plazmit DNA incelemesinde, 21 adet suşta 1-5 arasında değişen sayılarda plazmit DNA'ya rastlanılmıştır. Bu plazmit DNA'ların moleküler ağırlıklarının 3.11-28.07 kb arasında olduğu belirlenmiştir. 15 adet laktik asit bakterisinin ise plazmit DNA içermedikleri gözlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Laktik asit bakterileri, fizyolojik ve biyokimyasal özellik, SDS-PAGE, plazmit DNA

STUDYING OF PHYSIOLOGICAL, BIOCHEMICAL, PLASMID DNA AND PROTEIN PROFILES OF SOME LACTIC ACID BACTERIA*

Abstract

In this study, 36 lactic acid bacteria were isolated from kefir, White Pickled cheese, Kashar cheese and sucuk (a Turkish style fermented sausage). The isolated cultures were identified by biochemical tests and API 50 CH test kit. Total proteins of strains were carried on Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE). 36 strains were identified as *Leuconostoc cremoris* (1 strain), *Leu. mesenteroides* (1), *Lactobacillus brevis* (1), *Lb. casei* (2), *Lb. lactis* (2), *Lb. plantarum* (2), *Lb. helveticus* (3), *Lactococcus cremoris* (3), *Lac. lactis* (3), *Streptococcus durans* (1), *Strep. thermophilus* (2), *Pediococcus acidilactici* (2), *P. pentosaceus* (4) and *P. dextrinicus* (9). Plasmid DNA profiles of lactic acid bacteria were examined and their molecular weights were identified. Results indicated that 21 strains carried 1-5 plasmids and their molecular weights ranged between 3.11 and 28.07 kb. Remaining 15 strains did not carry any plasmid DNA.

Keywords: Lactic acid bacteria, physiological and biochemical properties, SDS-PAGE; plasmid DNA

* Bu makale, birinci yazarın Doktora tezinin bir bölümüdür / This paper is a part of corresponding author's Ph. D. thesis

** Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ zehranur@gazi.edu.tr, ☎ (+90) 312 202 1507, 📠 (+90) 312 212 2279

GİRİŞ

Laktik asit bakterileri (LAB), Gram-pozitif, fakültatif anaerob, katalaz negatif, hareketsiz (bir iki ayrıcalık gösteren üye dışında), sitokromdan yoksun, *Sporolactobacillus inulinus* dışında spor oluşturmayan, karbonhidrat fermantasyonu sırasında son ürün olarak laktik asit üreten bakterilerdir. Su ve toprakta hemen hemen hiç rastlanılmayan bu bakterilere, cins ve türe göre değişmek üzere süt ve süt ürünleri çalışma yerlerinde, bitki ve bitki atıklarında, insan, hayvan ve diğer canlıların barsak sistemlerinde rastlanır (1). LAB, B-vitaminleri ve aminoasitleri sentezleyebilmeleri için kompleks besi kaynaklarına ihtiyaç duyarlar (2). Düşük pH'larda asit üretirler, patojen ve kontaminant organizmaların gelişimlerini ürettikleri laktik asit, hidrojen peroksit, diasetil ve bakteriyosinler gibi maddelerle inhibe ederler (3).

Birçok bakterilerde ve bazı ökaryotik hücrelerde bulunan, ekstrakromozomal element olan plazmitler, küçük, çift sarmal DNA molekülleridir. Bakteriye plazmitler, antibiyotik direnci, virulens özellik veya çeşitli metabolik aktiviteler gibi fenotipik özelliklere dair genler taşırlar. Bazı plazmitler ise, fenotipte gözlenmeyen özelliklere dair genler taşırlar (kriptik plazmitler). Kendi kendine transfer olabilen veya konjugatif plazmitler, içerdikleri "tra" genleri sayesinde, diğer tür veya bakteriyel suşlara, plazmit kopyalarını transfer edebilme yeteneğindedirler (4). Plazmitlerin en önemli özelliği, yarı-bağımsız ve bağımsız olarak plazmitin replikasyonuna izin veren, replikasyon orijini adı verilen özel DNA bölgeleri taşımalarıdır (5). Laktik asit bakterilerinin çok sayıda plazmit içermeleri ve bunlardan bazılarının konjugasyon yoluyla diğer bakterilere aktarabilmesi, bu bakteri plazmitlerine olan ilgiyi daha da artmıştır (6).

Farklı cinsleri olan laktik asit bakterilerinin sınıflandırılması; morfoloji (kok, çubuk veya tetrat formasyon), glikoz fermantasyonu (homo-ve hetero-fermantasyon), farklı sıcaklıklarda gelişme (10–60 °C), laktik asit üretiminin konfigürasyonu, yüksek tuz konsantrasyonlarında gelişme yeteneği ve asit veya alkali toleransı temellerine dayanır. Yağ asitlerinin kompozisyonu ve hücre duvar unsurlarından da kemotaksonomik sınıflandırmada faydalanılmaktadır (7). Toplam protein profillerinin temeline dayanan SDS-PAGE, tür ve alttür

düzeyinde tanımlamalarda bakteriyel taksonomide kullanılmaktadır (8). Son yıllarda, LAB'nin tür ve suşlarının filogenetik pozisyonlarının belirlenmesinde daha güvenilir olduğu düşünülen ribozomal RNA'dan da yararlanılmaktadır (1).

Bu çalışmada, kefir, beyaz peynir, kaşar peyniri ve sucuktan laktik asit bakterileri izole etmek ve fizyolojik ve biyokimyasal testler ve SDS-PAGE yöntemi ile elde edilen protein profillerine göre, izolatların tanımlanması amaçlanmıştır. Araştırmada, ayrıca suşların plazmit DNA sayı ve moleküler ağırlıklarının da belirlenmesi hedeflenmiştir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Örneklerin Hazırlanması, İzolasyon ve Tanımlama

İzolasyonlar, 15 farklı kefir örneği ve 5 farklı kaşar peyniri, beyaz peynir ve sucuk örneklerinden yapılmıştır. Fizyolojik su ile homojonize edilen kefir, kaşar peyniri, beyaz peynir ve sucuk örneklerinden 10⁻¹'den 10⁻⁶'ya kadar seri dilüsyonlar hazırlanarak, *Leuconostoc* spp. ve *Lactobacillus* spp. için MRS katı besiyeri (Merck), *Streptococcus* spp. ve *Lactococcus* spp. için M17 katı besiyeri (Merck) ve *Pediococcus* spp. için tomato juice katı besiyeri (Merck) üzerine ekimler yapılmış ve farklı inkübasyon sıcaklıklarında (30-45 °C) 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda besiyerlerinde gelişen beyaz-krem ve/veya beyaz-şeffaf-gri renkli koloniler seçilmiştir. İzolatların ayırt edilmesi amacıyla çeşitli fizyolojik ve biyokimyasal testlerden yararlanılmıştır. Bakterilerin morfolojileri, Gram boyamaya karşı reaksiyonu ve katalaz reaksiyonları belirlenmiştir. Daha sonra, izolatların 10/15 °C, 45 °C ve 50/60 °C'de gelişmeleri, %2 NaCl, %4 NaCl, %6.5 NaCl, %18 NaCl içeren besiyerlerinde üreyebilme yetenekleri, glikozdan gaz oluşumu, eskulin ve arjinin hidrolizi reaksiyonları incelenmiştir (9). 36 adet izolat, daha sonraki tanımlama testleri için seçilmiştir. İzolatlar, -20 °C'de %10 gliserol (Merck) içeren MRS/M17 sıvı besiyerlerinde depolanmış ve uygulamalarda kullanılmadan önce iki defa aktifleştirilmişlerdir. İzolatların karbonhidrat fermantasyon profilleri, API CH 50 kiti kullanılarak incelenmiştir (API Sistem, Bio-Merieux, France). Türler, Wood ve Holzapfel (10) tarafından standart taksonomik tanımlamalarına ve APILAB PLUS (Version 3.2.2.) kullanılarak belirlenmiştir.

Toplam Hücre Protein Ekstraksiyonu

Protein ekstraksiyonu Tan ve arkadaşlarının yöntemine göre yapılmıştır (11). Aktif bakteriler, uygun besiyerinde ve uygun inkübasyon sıcaklıklarında (Çizelge 1) 48 saat inkübe edilmiştir. Hücre kültürü santrifüj edilerek pelet elde edilmiştir. Peletler steril 50 mM Fosfat tamponu (pH 7.0) ile homogenize edilmiş ve 50 MHz ultrasonikasyon ile buz içerisinde sonike (Vibra-Cell, Sonics&Materials Inc. Danbury, CT USA marka) edilmiştir. Örnekler santrifüj edilerek hücre kalıntıları çöktürülmüş ve süpernatant elde edilmiştir. Elektroforezden

önce örnek tamponu ile muamele edilerek 5 dk. kaynatılmıştır. Her bir örneğin protein miktarları (Protein Assay Bradford Method kiti, Amresco) eşitlendikten sonra elektroforez işlemine geçilmiştir. Elektroforez işlemi Laemmli'ye (12) göre yapılmıştır. Jeller Coomassie Brilliant Blue R250 (Sigma) ile boyanmıştır. Protein çalışmasında, her jelde referans suş kullanılmıştır. Bu referans suşun (*Lactobacillus plantarum* ATCC 20246) protein bantlarına göre var (1) ya da yok (0) şeklinde bir matriks oluşturulmuştur. Elde edilen bu matriks, SPSS 11,0 programında analiz edilmiştir (13).

Çizelge 1. Laktik asit bakterilerine ait suşların izole edildiği kaynaklar ve optimum gelişme sıcaklıkları

No	Bakteri	İzole Edildiği Kaynak	Optimum Gelişme Sıcaklığı (°C)
1	<i>Leuconostoc cremoris</i> B1Leu	Kaşar Peyniri	25 °C
2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> B2Leu	Kaşar Peyniri	30 °C
3	<i>Lactobacillus helveticus</i> Hy1L	Kefir	45 °C
4	<i>Lactobacillus helveticus</i> Hy2L	Kefir	45 °C
5	<i>Lactobacillus helveticus</i> Hy5L	Kefir	45 °C
6	<i>Lactobacillus brevis</i> Hy20L	Kefir	30 °C
7	<i>Lactobacillus casei</i> Lc6	Beyaz Peynir	37 °C
8	<i>Lactobacillus casei</i> Hy6L	Kefir	37 °C
9	<i>Lactobacillus lactis</i> LI2	Beyaz Peynir	30 °C
10	<i>Lactobacillus lactis</i> Hy17L	Kefir	30 °C
11	<i>Lactobacillus plantarum</i> Lp7	Beyaz Peynir	30 °C
12	<i>Lactobacillus plantarum</i> Lp21	Beyaz Peynir	30 °C
13	<i>Streptococcus thermophilus</i> Ba21S	Kefir	42 °C
14	<i>Streptococcus thermophilus</i> Zm5S	Kefir	42 °C
15	<i>Streptococcus durans</i> Zm7S	Kefir	30 °C
16	<i>Lactococcus cremoris</i> Zm8S	Kefir	30 °C
17	<i>Lactococcus cremoris</i> Zm14S	Kefir	30 °C
18	<i>Lactococcus cremoris</i> Zm21S	Kefir	30 °C
19	<i>Lactococcus lactis</i> Zm1S	Kefir	30 °C
20	<i>Lactococcus lactis</i> SL2	Beyaz Peynir	30 °C
21	<i>Lactococcus lactis</i> SL24	Beyaz Peynir	30 °C
22	<i>Pediococcus dextrinicus</i> ZN1P	Beyaz Peynir	35 °C
23	<i>Pediococcus dextrinicus</i> ZN3P	Beyaz Peynir	35 °C
24	<i>Pediococcus dextrinicus</i> ZN4P	Beyaz Peynir	35 °C
25	<i>Pediococcus dextrinicus</i> ZN5P	Beyaz Peynir	35 °C
26	<i>Pediococcus dextrinicus</i> ZN6P	Kaşar Peyniri	35 °C
27	<i>Pediococcus dextrinicus</i> ZN8P	Kaşar Peyniri	35 °C
28	<i>Pediococcus dextrinicus</i> ZN11P	Sucuk	35 °C
29	<i>Pediococcus dextrinicus</i> 8459	Beyaz Peynir	35 °C
30	<i>Pediococcus dextrinicus</i> K.73	Beyaz Peynir	35 °C
31	<i>Pediococcus acidilactici</i> ZN2P	Beyaz Peynir	35 °C
32	<i>Pediococcus acidilactici</i> ZN10P	Sucuk	35 °C
33	<i>Pediococcus pentosaceus</i> ZN7P	Kaşar Peyniri	35 °C
34	<i>Pediococcus pentosaceus</i> ZN9P	Sucuk	35 °C
35	<i>Pediococcus pentosaceus</i> ZN12P	Sucuk	35 °C
36	<i>Pediococcus pentosaceus</i> ZN13P	Sucuk	35 °C

Plazmit DNA İzolasyonu

Suşların plazmit DNA izolasyonu O'svullivian ve Klaenhammer'in (14) yöntemine göre çıkarılmıştır. Aktif örnekler santrifüj edilmiş, peletlerin üzerine 200 µl solüsyon-I'den (30 mg/ml, %25 sakkaroz, 50 mM TRIS, 1mM EDTA, pH: 7.4), 400 µl solüsyon-II'den (%3 SDS, 0.2 N NaOH) ve 300 µl solüsyon-III'den (3 M Sodyum Asetat pH: 4.8) ilave edilerek santrifüj edilmiştir. Süpernatant üzerine 650 µl izopropanol konulduktan sonra santrifüj edilmiştir. Örneklerin üzerine solüsyon-IV (7.5 M Amonyum Asetat, 0.5 mg/ml Etidyum Bromit) ve fenol:kloroform (1:1 v/v)'dan sırasıyla 200 µl ve 350 µl ilave edilerek santrifüj yapılmıştır. Üst kısım yeni eppendorf tüpüne alınarak, üzerine 1000 µl saf etil alkol ilave edilmiş, alkol uzaklaştırılmıştır. %70'lik etil alkol konularak, santrifüj edilmiştir. Alkol uzaklaştırılarak, peletler kurutulmuştur. Pelet, 40 µl TE+RNaz (0.1 mg/ml) ile homojenize edilmiş ve 2 µl Loading Buffer ile boyanmıştır. Elektroforez, 40 Volt'ta 2–2.5 saat süre ile yapılmıştır. Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra ortamdan alınan jel, 0.2 µg/ml etidyum bromit içeren TAE tamponun'da boyanmıştır. Boyama işleminin sonunda jel, TAE tamponu ile yıkanmış ve 256 nm dalga boyunda ultraviyole ışığında incelenmiştir (15). UV ışığı altında iken suşların polaroid fotoğraf makinesi ile fotoğrafları çekilmiş ve plazmit DNA'larının büyüklükleri saptanmıştır (Super Coiled DNA Ladder, Sigma) (16).

TARTIŞMA VE SONUÇ

Kefir tanelerinin laktozu fermente eden ve etmeyen mayalar ile homofermentatif ve heterofermentatif laktik asit bakterileri ve asetik asit bakterilerinin farklı türlerini içeren kompleks bir mikrofloraya sahip olduğu bildirilmiştir (17, 18). Bu çalışmada, Türkiye orijinli kefirlerden 13 adet laktik asit bakterisi izole edilmiştir. Biyokimyasal testler ve API CH 50 kitlerinin kullanılmaları sonucunda, izolatlar *Lactobacillus helveticus* (3 adet), *Lb. brevis* (1 adet), *Lb. casei* (1 adet), *Lb. lactis* (1 adet), *Streptococcus thermophilus* (2 adet), *Strep. durans* (1 adet), *Lactococcus cremoris* (3 adet) ve *Lac. lactis* (1 adet) olarak tanımlanmıştır (Çizelge 1-2).

Kefir tanelerindeki mikrofloranın belirlenmesine yönelik yapılmış birçok çalışmada sonucunda, *Lb. brevis*, *Lb. gasseri*, *Lb. fermentum* ve *Lb. casei* (19), *Lb. kefir* (20) *Lac. lactis*, *Lac. cremoris*, *Lac. fi-*

lant (19, 21), *Str. paracitrovarus* (19), *Str. thermophilus* (22) türlerine ait suşların kefir mikroflorasında bulunduğu bildirilmiştir. Elde edilen sonuçlar tanelerdeki mikroorganizma türünün tanelerin orijinine göre değiştiğini göstermiştir. Bu nedenle tanelerdeki mikroorganizma türü konusunda farklı bildirişler vardır.

Bakteri, maya ve küfeleri içeren peynir karmaşık bir mikrofloraya sahiptir. Bu organizmalar arasından bakteriler, peynir yapımı sırasında fizikokimyasal ve aromatik transformasyonlardan sorumludurlar. Geleneksel Türk ürünlerinden Van yöresine özgü peynirden izole edilen *Lactobacillus plantarum*, *Lb. casei* ssp. *casei*, *Lb. brevis*, *Pediococcus pentosaceus*, *P. acidilactici*, *Enterococcus faecalis* ve *E. faecium* olarak tanımlanmıştır. Peynirde en yaygın olarak *Lb. plantarum*, *Lb. casei* ve *P. pentosaceus*'un bulunduğu bildirilmiştir (23). Fermente sucuk örneklerinden izole edilen toplam 147 laktik asit bakterisinin tanımlanması sonucunda, suşların %90'nının laktobasiller, %4'ünün enterokoklar ve %3'ünün pediokok türlerinin oluşturduğu bildirilmiştir (24). Çalışmada, beyaz peynir, kaşar peyniri ve sucuk örneklerinden izole edilen toplam 23 adet laktik asit bakterisinin %8.70'i *Leuconostoc* sp., %8.70'i *Lactococcus* sp., %17.39'u *Lactobacillus* sp., %65.21'i *Pediococcus* sp. olarak tanımlanmıştır (Çizelge 1–2).

Proteinlerin aminoasit dizilişleri, serolojik özellikleri ve protein profilleri sistematiğe önemli bir yer tutmaktadır. Günümüzde poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE), değişik mikroorganizmaların protein profillerine göre tanımlanması ve sınıflandırılmasında sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Birçok araştırmacı toplam hücre proteini, toplam çözünür protein, sitoplazmik membran proteini, hücre duvar ve yüzey proteinlerinin elektroforetik görünümünün laktik asit bakteri taksonomisinde ve tanımlanmasında uygun bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir (18, 25). Çalışmada, LAB türlerinin tanımlama ve sınıflandırılmasında morfolojik ve biyokimyasal özellikleri ile poliakrilamid jel elektroforezi uygulamalarından da yararlanılmıştır. Nitekim LAB türlerinin tanımlanmasında poliakrilamid jel elektroforezi kullanımı birçok araştırmacı tarafından önerilmiştir (26, 27).

Yapılan bir çalışmada geleneksel İtalyan inek, keçi ve bufalo peynirlerinden elde edilen 124 adet *Enterococcus* suşu tanımlanmıştır. Toplam hücre protein profilleri, SDS-PAGE yöntemi ile incelen-

Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Fizyolojik, Biyokimyasal, Plazmit Dna ve...

Çizelge 2. Laktik asit bakterilerinin API 50 CH kiti ile tanımlanma sonuçları ve referans suşla % benzerlik ve % farklılıkları

Bakteri	API ile tanımlanma sonucu	SDS-PAGE	
		% Benzerlik	% Farklılık
<i>Leu. cremoris</i> B1Leu	%91.4	60	40
<i>Leu. mesenteroides</i> B2Leu	%94.4	63	37
<i>Lb. helveticus</i> Hy1L	%92.7	81	19
<i>Lb. helveticus</i> Hy2L	%88.8	81	19
<i>Lb. helveticus</i> Hy5L	%86.8	81	19
<i>Lb. brevis</i> Hy20L	%79.9	79	21
<i>Lb. casei</i> Lc6	%85.4	80	20
<i>Lb. casei</i> Hy6L	%91.4	80	20
<i>Lb. lactis</i> LI2	%90.2	83	17
<i>Lb. lactis</i> Hy17L	%98.7	88	12
<i>Lb. plantarum</i> Lp7	%98.4	92	18
<i>Lb. plantarum</i> Lp21	%98.5	98	2
<i>Strep. thermophilus</i> Ba21S	%95.5	66	33
<i>Strep. thermophilus</i> Zm5S	%95.1	65	35
<i>Strep. durans</i> Zm7S	%93.1	60	40
<i>Lac. cremoris</i> Zm8S	%94.4	62	38
<i>Lac. cremoris</i> Zm14S	%88.1	50	50
<i>Lac. cremoris</i> Zm21S	%99.1	57	43
<i>Lac. lactis</i> Zm1S	%87.6	73	37
<i>Lac. lactis</i> SL2	%88.1	52	48
<i>Lac. lactis</i> SL24	%88.1	56	43
<i>P. dextrinicus</i> ZN1P	%99.1	57	43
<i>P. dextrinicus</i> ZN3P	%94.4	50	50
<i>P. dextrinicus</i> ZN4P	%80.1	47	53
<i>P. dextrinicus</i> ZN5P	%79.9	48	51
<i>P. dextrinicus</i> ZN6P	%98.7	50	50
<i>P. dextrinicus</i> ZN8P	%86.8	50	50
<i>P. dextrinicus</i> ZN11P	%93.5	48	52
<i>P. dextrinicus</i> 8459	%94.4	50	50
<i>P. dextrinicus</i> K.73	%91.4	58	42
<i>P. acidilactici</i> ZN2P	%93.3	47	53
<i>P. acidilactici</i> ZN10P	%80.5	40	60
<i>P. pentosaceus</i> ZN7P	%95.5	41	59
<i>P. pentosaceus</i> ZN9P	%94.4	44	56
<i>P. pentosaceus</i> ZN12P	%87.6	44	56
<i>P. pentosaceus</i> ZN13P	%88.1	44	56

miştir. İnceleme sonucunda suşların dağılımı; *Enterococcus faecalis* (82 suş), *E. faecium* (27 suş), *E. durans* (9 suş), *E. gallinarum* (4 suş) ve *E. hirac* (2 suş) olarak gösterilmiştir (28). Sánchez ve arkadaşları (29), 149 adet laktik asit bakterilerinin sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi kullanarak hücre duvar proteinleri ile fenotipik tanımlamalarını desteklemişler ve suşları *Lactobacillus plantarum*, *Lb. pentosus*, *Lb. brevis* biotip 2, *Lb. brevis* biotip 3, *Lb. fermentum* ve *Aerococcus viridans* olarak tanımlanmışlardır. Leisner ve arkadaşları (30), Malezya gıda ürünlerinden izole ettikleri 92 adet laktik asit bakterisini geleneksel fenotipik testler ile tanımlamışlar ve SDS-PAGE ile de sonuçları karşılaştırmışlardır.

Çalışmada, laktik asit bakterilerine ait *Leu. cremoris*, *Leu. mesenteroides*, *Lb. helveticus*, *Lb. brevis*, *Lb. casei*, *Lb. lactis*, *Lb. plantarum*, *Strep. thermophilus*, *Strep. durans*, *Lac. cremoris*, *Lac. lactis*, *P. dextrinicus*, *P. acidilactici* ve *P. pentosaceus* olmak üzere 14 farklı türe ait suşlarının elektroforetik görünüşleri incelenerek referans suşla benzerlik ve farklılıkları karşılaştırılmıştır. Referans suşla (*Lactobacillus plantarum* ATCC 20246), suşların benzerlik ve farklılıkları Çizelge 2'de gösterilmiştir. Çalışmada aynı türe ait suşların birbirine benzer elektroforetik bir yapı göstermelerine rağmen, türlerin birbirlerinden ayrıldıkları tespit edilmiştir. API ve diğer testlerle tanımlanan türlerin, çıkarılan matrikse göre de benzerlik gösterdiği tespit edil-

miştir. Türlerin tanımlanmasında protein profilleri, diğer testleri destekleyici olarak kullanılmıştır. Türlerin asıl tanımlanmaları bu testlerin yanı sıra doğruluğu daha kesin olan 16S rRNA ve DNA sekans analizleri gibi moleküler çalışmalar ile mümkün olacağı bildirilmektedir (31, 32).

Plazmit DNA'lar bakteriyel hücrede stabil olmayan DNA parçalarıdır. Bir hücreden kaybolup tekrar kazanıldıkları bildirilmiştir. Kaybolduklarında üzerlerinde taşıdıkları kodları da kaybolmaktadır. Tür içinde bile bakteriyel hücrelerin taşıdıkları plazmit bantların değişebileceği gösterilmiştir (33). Laktik asit bakterilerinin çok sayıda plazmit içermeleri ve bunlardan bazılarının konjugasyon yoluyla diğer bakterilere aktarabilmesi, bu bakteri plazmitlerine olan ilgiyi daha da artmıştır (6). Laktik asit bakterilerinde bulunan plazmitlerin, laktoz ve sitrat fermantasyonu (34), bakteriosin ve/veya hemolizin gibi maddeleri kodlayabildiği ile ilgili birçok araştırma yapılmıştır (6, 35).

Çalışmada 36 adet laktik asit bakterisinin plazmit DNA profilleri çalışılmış ve suşlarda tespit edilen plazmit DNA sayı ve moleküler ağırlıkları Çizelge 3'te verilmiştir. *Streptococcus durans* Zm8S suşu-

nun plazmit DNA jel elektroforez görünümü Şekil 1'de gösterilmiştir. İncelenen 36 adet suşun 15 adedinde plazmit DNA'ya rastlanılmamış, plazmit DNA tespit edilen suşlardaki sayıları 1–5 arasında bulunmuş ve moleküler ağırlıkları 3.11–28.07 kb arasında hesaplanmıştır.



Şekil 1. *Streptococcus durans* Zm8S suşunun plazmit DNA profilleri (M: Marker: 16.210 kb - 14.174 kb - 12.138 kb - 10.102 kb - 8.066 kb - 7.048 kb - 6.030 kb - 3.990 kb - 2.972 kb - 2.067 kb).

Çizelge 3. Bazı laktik asit bakterilerinde tespit edilen plazmit DNA sayısı ve moleküler ağırlıkları

Suşlar	Plazmit DNA Sayısı	Moleküler Ağırlık (kb)
<i>Leu. cremoris</i> B1Leu	1	14.21
<i>Leu. mesenteroides</i> B2Leu	1	14.46
<i>Lb. helveticus</i> Hy1L	4	17.62 - 14.39 - 8.28 - 3.36
<i>Lb. helveticus</i> Hy2L	4	16.13 - 13.78 - 8.29 - 3.86
<i>Lb. helveticus</i> Hy5L	5	21.72 - 16.19 - 14.21 - 8.26 - 3.94
<i>Lb. brevis</i> Hy20L	1	13.30
<i>Lb. casei</i> Hy6L	3	12.89 - 7.96 - 3.79
<i>Lb. lactis</i> LI2	2	26.13 - 24.32
<i>Lb. lactis</i> Hy17L	1	17.77
<i>Lb. plantarum</i> Lp7	3	28.07 - 22.03 - 17.29
<i>Lb. plantarum</i> Lp21	1	14.44
<i>Strep. thermophilus</i> Zm5S	2	19.69 - 13.65
<i>Strep. durans</i> Zm8S	4	12.55 - 8.55 - 7.27 - 4.09
<i>Lac. cremoris</i> Zm21S	3	13.26 - 8.52 - 6.01
<i>Lac. lactis</i> Zm1S	4	15.97 - 14.60 - 12.53 - 4.79
<i>Lac. lactis</i> SL2	5	16.75 - 10.79 - 8.93 - 6.18 - 3.11
<i>Lac. lactis</i> SL24	4	15.52 - 11.33 - 9.09 - 7.98
<i>P. dextrinicus</i> ZN1P	1	16.96
<i>P. dextrinicus</i> ZN3P	1	17.50
<i>P. dextrinicus</i> ZN4P	3	23.65 - 20.67 - 18.06
<i>P. acidilactici</i> ZN2P	2	23.44 - 17.35
<i>P. acidilactici</i> ZN10P	1	16.58

Belkum ve arkadaşları (36), *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 9B4 suşundan izole edilen 60 kilobazlık plazmit DNA'nın bakteriyosin üretiminden sorumlu olduğu bildirilmiştir. Hasting ve Stiles (37), et ürünlerinden *Leuconostoc gelidum* olarak tanımladıkları heterofermantatif bir bakteri izole etmişler ve bu suşun 5.0 - 14.1 MDa arasında değişen 6 adet plazmit DNA içerdiğini bildirmişlerdir. Kim ve arkadaşları (38), *Pediococcus acidilactici* M'in ve mutant suşlarının 53.7 kb'lik sakkaroz hidrolizinden ve 11.1 kb'lik bakteriosin üretiminden sorumlu plazmitleri içerdiğini rapor etmişlerdir. *Streptococcus lactis* 1145 suşunda 28 Md'luk plazmitin sakkaroz ve nisin üretimini kontrol ettiği saptanmıştır (39). Bütün bu araştırmalar, laktik asit bakterilerinin içerdiği plazmitlerin farklı metabolik ürünlerin sentezinden sorumlu olduğunu göstermektedir.

KAYNAKLAR

- Hofvendahl K, Hahn-Hägerdal B. 2000 Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme Microb Technol*, 26: 87–107.
- Tunali N, Köşker. 1989. *Süt Mikrobiyolojisi*. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No:1116 Ankara, 18–19.
- Zhu WM, Liu M, Wu DQ. 2000. Isolation and characterization of a new bacteriocin from *Lactobacillus gasseri* KT7. *J Appl Microbiol*, 88: 877–886.
- Woodford N (ed), Johnson AP. 1998. *Plasmid Analysis*. Humana Press, New Jersey, USA, 356 p.
- Turner PC, McLennon AG, Bates AD, White MRH. 2000. Instant Notes Molecular Biology. School of Biological Sciences, University of Liverpool, 103.
- Martinez-Bueno M, Valdivia E, Galvez A, Maqueda M. 2000. pS86 a new theta-replicating plasmid from *Enterococcus faecalis*. *Curr Microbiol*, 41: 257–261.
- Axelsson LT. 1993. *Lactic acid bacteria: classification and physiology*. In: Salminen S., von Wright, A., editors. Lactic acid bacteria. New York: Marcel Dekker, Inc., 1-72.
- Qhobela M, Leach JE, Clafin LE, Pearson DL. 1991. Characterisation of starins of *Xanthomonas campestris* pv. *holcicola* by PAGE of membrane proteins and by REA and RFLP analysis of genomic DNA. *Plant Disease*, 75: 32–36.
- Harrigan W, McCance M. 1990. *Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology* (8th ed). London, UK: Academic Pres.
- Wood BJB, Holzapfel WH. 1995. *The Genera of Lactic Acid Bacteria*, vol. 2, Blackie Academic and Professional, Glasgow.
- Tan ZY, Xu XD, Wang ET, Gao TL, Romero EM, Chen WX. 1997. Phylogenetic and genetic relationships of *Mesorhizobium tianshanense* and related *Rhizobia*. *Int J Syst Bacteriol*, 47: 874–879.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680–685.
- Wolff K, Peters-van Rijn J. 1993. Rapid detection of genetic variability in chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) using random primers. *Heredity*, 71: 335–341.
- O'sullivan DJ, Klaenhammer TR. 1993. Rapid miniprep isolation of high-quality plasmid DNA from *Lactococcus* and *Lactobacillus* spp. *Appl Environ Microbiol* 59: 2730–2733.
- Macrina FL, Tobian JA, Jones KR, Evans RP, Clewell DB. A cloning vector able to replicate in *Escherichia coli* and *Streptococcus sanguis*. *Gene*, 19: 345–353.
- Sambrook J (ed), Fidsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Pres, UK, 643p.
- Piodux M, Marshall VM, Zanoni P, Brooker B. 1990. *Lactobacilli* isolated from sugary kefir grains capable of polysaccharide production and minicell formation. *J Appl Bacteriol* 69: 311–320.
- Yuksekdag ZN, Beyatli Y, Aslim B. 2004. Determination of some characteristics coccoid forms of lactic acid bacteria isolated from Turkish kefir with natural probiotic. *Lebensm-Wiss Technol*, 37: 663–667.
- Angulo L, Lopez E, Lema C. 1993. Micro flora present in kefir grain of the galician region (northwest of Spain). *J Dairy Research*, 60: 263–267.
- Marshall VM, Colc WM, Farrow, JA. 1984. A note on the heterofermentative *Lactobacillus* isolated from kefir grains. *J Appl Bacteriol*, 56: 503–505.
- Simova ED, Beskova DM, Angelov A, Hristozova TS, Frengova G, Sposov Z. Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. *J Industrial Microbiol Biotechnol*, 28: 1–6.
- Beskova DM, Simova ED, Simov ZI, Frengova GI, Spasov ZN. 2002. Pure cultures for making kefir. *Food Microbiol*, 19: 537–544.
- Sagdic O, Simsek B, Kucukoner E. 2003. Microbiological and physiochemical characteristics of Van herby cheese, a traditional Turkish dairy product. *Milchwissenschaft*, 58: 382–385.

24. Papamanoli E, Tzanetakis N, Litopoulou-Tzanetaki E, Katzekidou P. 2003. Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Grek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. *Meat Sci*, 65: 859–867.
25. Flint SH, Brooks JD, Bremer PJ. 1997. The influence of cell surface properties of thermophilic streptococci on attachment to stainless steel. *J Appl Microbiol* 83: 508–517.
26. Ercolini D, Moschetti G, Blaitta G, Coppola S. 2001. Behavior of variable V3 region from 16S rDNA of lactic acid bacteria in denaturing gradient gel electrophoresis. *Curr Microbiol*, 42: 199–202.
27. Ozkaya FD, Xanthopoulos V, Tunail N, Tzanetaki EL. 2001. Technologically important properties of lactic acid bacteria isolated from Beyaz cheese made from raw ewes' milk. *J Appl Microbiol* 91: 861–870.
28. Andrighetto C, Knijff E, Lombardi A, Torriani S, Vancanneyt M, Kersters K, Swings J, Dellaglio F. 2001. Phenotypic and genetic diversity of enterococci isolated from Italian cheeses. *J Dairy Res*, 68: 303–316.
29. Sánchez I, Seseña S, Palop L. 2003. Identification lactic acid bacteria from spontaneous fermentation of Almagro eggplants SDS-PAGE whole cell protein fingerprinting. *Int J Food Microbiol*. 82: 181–189.
30. Leisner JJ, Pot B, Christensen H, Rusul G, Olsen JE, Wee BW, Muhammad K, Ghali HM. 1999. Identification of lactic acid bacteria from ohili bo, a Malaysian food ingredient. *Appl Environ Microbiol*, 65 (2): 599–605.
31. Hertel C, Lutwik W, Pot B, Kersters K, Schleifer KH. 1993. Differentiation of lactobacilli occurring in fermented milk products by using oligonucleotide probes and electrophoretic protein profiles. *System Appl Microbiol* 16: 463–467.
32. De Angelis M, Corsetti A, Tosti N, Rossi J, Corbo MR, Gobbetti M. Characterization of non-starter lactic acid bacteria from Italian ewe cheeses based on phenotypic, genotypic and cell wall protein analyses. *Appl Environ Microbiol*, 67: 2011–2020.
33. Arda M. 2000. *Temel Mikrobiyoloji*. İkinci baskı. Medisan Yayınları, Ankara, 490–548.
34. Nakamura S, Tagawa Y, Miyamoto T, Kataoka K. 1992. Plasmid profiles of lactose-, citrate- and proteinase-negative mutants of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* strain N-7. *Milchwissenschaft*, 47: 358–361.
35. McKay LL. 1983. Functional properties of plasmids in lactic streptococci. *Anton. Van Leeuw*, 49: 259–274.
36. van Belkum MJ, Hayema B, Geis A, Kok J, Venema G. 1989. Cloning of two bacteriocin genes from a lactococcal bacreioicin plasmid. *Appl Environ Microbiol*, 55: 1187–1191.
37. Hastings JW, Stiles ME. 1991. Antibiosis of *Leuconostoc gelidum* isolated from meat. *J Appl Bacteriol* 70: 127–134.
38. Kim WJ, Ray B, Johnson MC. 1992. Plasmid transfers by conjugation and electroporation in *Pediococcus acidilactici*. *J Appl Bacteriol*, 72: 201–207.
39. Leblanc DJ, Crow VL, Lee LN. 1980. In: *Plasmid and transposon environmental effects and maintenaces mechanisms*. Stutard W (chief ed), Academic Press, New York, USA, pp. 31.