

1-1-2000

Identification of Lactoce Plasmids in *Lactococcus lactis* subsp. *lactisStains*

ÇAĞLA TÜKEL

MUSTAFA AKÇELİK

Follow this and additional works at: <https://journals.tubitak.gov.tr/biology>



Part of the [Biology Commons](#)

Recommended Citation

TÜKEL, ÇAĞLA and AKÇELİK, MUSTAFA (2000) "Identification of Lactoce Plasmids in *Lactococcus lactis* subsp. *lactisStains*," *Turkish Journal of Biology*: Vol. 24: No. 3, Article 3. Available at: <https://journals.tubitak.gov.tr/biology/vol24/iss3/3>

This Article is brought to you for free and open access by TÜBİTAK Academic Journals. It has been accepted for inclusion in Turkish Journal of Biology by an authorized editor of TÜBİTAK Academic Journals. For more information, please contact academic.publications@tubitak.gov.tr.

***Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Suşlarında Laktoz Plazmidlerinin Tanımlanması**

Çağla TÜKEL, Mustafa AKÇELİK

Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, 06110, Ankara-TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 05.08.1999

Özet: Elli *L. lactis* subsp. *lactis* suşunda laktik asit fermentasyonu özelliğini kodlayan plazmidler araştırıldı. Doğal suşlardan laktik asit fermentasyonu özelliğinin (Lac⁺) eliminasyonu, akriflavin uygulaması ile sağlandı. Laktik asit fermentasyonu özelliğini kaybeden (Lac⁻) mutantlar, laktoz indikatör agar ortamlarında seçildi. Lac⁺ mutantlar ise plazmid analizleri yapılarak tanımlandı. Lac⁻ ve Lac⁺ mutantların plazmid içeriklerinin karşılaştırılması sonucu, 50 suş için 6 farklı laktoz plazmid saptandı. Bu laktoz plazmidlerinin moleküler büyüklükleri 26,3-38,5 kb arasında değişim gösterdi.

Anahtar Sözcükler: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, laktik asit fermentasyonu, plazmid.

Identification of Lactose Plasmids in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Strains

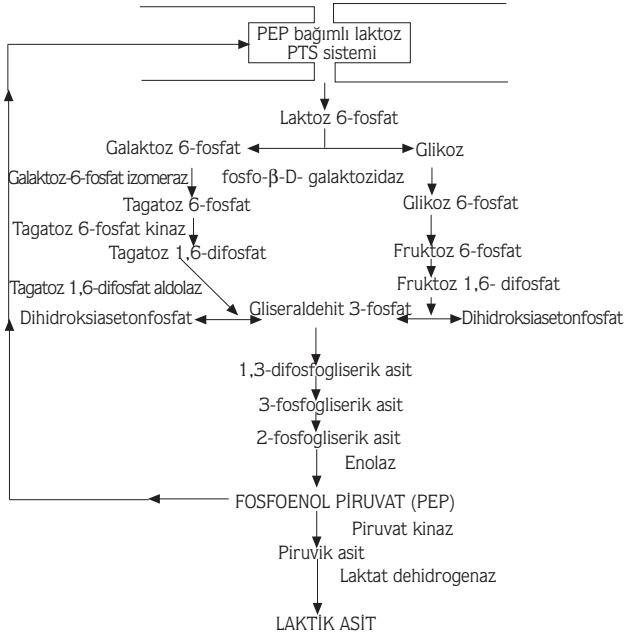
Abstract: Plasmids encoding lactic acid fermentation ability were investigated in 50 strains of *L. lactis* subsp. *lactis*. Acriflavine was used for the elimination of lactose fermentation ability (Lac⁺) from wild type strains. Lactose negative (Lac⁻) mutants were selected on lactose indicator agar media. Six different lactose plasmids were identified for fifty strains by comparison of plasmid profiles of Lac⁻ and Lac⁺ mutants. The molecular sizes of these lactose plasmids ranged between 26.3 and 38.5 kb.

Key Words: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, lactic acid fermentation, plasmid.

Giriş

Süt endüstrisinde starter bakteriler olarak kullanılan laktokok suşlarının fermentasyon süreçlerindeki en önemli rollerinden biri, süt şekeri olan laktozu fermente ederek laktik asit oluşturmalarıdır (1). Bu starter bakterilerde laktoz metabolizması; diğer Gram pozitif bakterilerin çoğunluğunda bulunmayan, fosfoenol piruvata bağımlı fosfotransferaz sistemi (PEP-PTS) tarafından başlatılmaktadır. Bu sistemde laktoz hücre içine fosforile formda alınmakta ve fosfo-β-galaktozidaz enzimi aktivitesi ile glikoz ve galaktoz 6-fosfata parçalanmaktadır. Bu aşamadan sonra glikoz Embden-Mayerhof-Parnas (EMP), galaktoz 6-fosfat ise tagatoz 6-fosfat yolu ile katabolize edilmektedir (Şekil 1) (2, 3).

Fosfotransferaz (PTS) sisteminin laktoz spesifik bileşenleri (Enzim II^{lac} ve Faktör III^{lac}), fosfo-β-D galaktozidaz ve tagatoz-6- fosfat yolunun üç enziminin (galaktoz-6-fosfat izomeraz,



Şekil 1. Laktokok suşlarının laktoz metabolizması (2, 3).

tagatoz-6-fosfat kinaz ve tagatoz-1,6-difosfat aldolaz) gen kodunun, *Lactococcus lactis* suşlarında farklı plazmidler üzerinde bulunduğu saptanmıştır (1, 3, 4). Starter kültür suşlarında laktoz metabolizması özelliğinin plazmidler tarafından kodlanması, stabilite sorununu doğurmaktadır. Özellikle laktoz plazmidlerinin konakçı suşlarda düşük kopya sayısında regüle edilmeleri, bu plazmidlerin eliminasyonu üzerinde etkili olmakta ve laktik asit fermentasyonu özelliğini kaybetmiş (Lac^-) mutantların meydana gelme sıklığı artmaktadır (3, 4, 5, 6). Starter kültür suşlarının seçiminde, bu mikroorganizmaların endüstriyel öneme sahip özelliklerinin stabil olması ve yüksek aktivite içermeleri esas alınmaktadır (7, 8). Laktokok suşlarında, laktoz plazmidlerinin tanısı bu açıdan büyük önem taşımaktadır (9).

Bu araştırmada, Türkiye kökenli 50 *L. lactis* subsp. *lactis* suşunda laktik asit fermentasyonu özelliğini kodlayan plazmidlerin mutant seçme ve analiz çalışmaları ile tanımlanması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Bakteri İzolasyonu ve Tanısı

Starter kültür kullanmayan klasik süt işletmelerinden sağlanan çiğ süt ve peyniraltı suyu örneklerinden (Tablo 1) laktokokların izolasyonunda neutral red chalk lactose agar (NRCLA) (10) kullanılmıştır. İzolatlardan *L. lactis* subsp. *lactis* suşlarının tanısında ise; Gram boyama, katalaz testi, Elliker broth' da gelişme (30°C), Reddy agarda arjinin testi, M17 agarda mannitol

fermentasyonu, Elliker broth' da % 6,5 NaCl varlığında (30°C), pH 9,6' da (30°C), 40°C' de ve 45°C' de gelişme ve sitrattan diasetil oluşturma özellikleri esas alınmıştır (11, 12). Bakteriler M17 dik agar besiyerinde +4°C'de ve litmuslu süt ortamlarında -20°C' de saklanmıştır (11).

***L. lactis* subsp. *lactis* Suşlarına Akriflavin Uygulanması**

L. lactis subsp. *lactis* suşları laktoz indikatör agar ortamında (13) geliştirildikten sonra, laktik asit fermentasyonu yeteneğini sürdüren (Lac⁺) tek koloniler alınmış ve M17 broth' da (14) iki kez kültüre edilmiştir. Bu ortamda 16 saat üretilen (30°C) suşlar, farklı oranlarda akriflavin içeren M17 broth ortamlarına inoküle edilmiş ve 30°C' de 24 saat tutulmuştur. İnkübasyon süresi sonunda akriflavin uygulamasına tabi tutulan suşlar dilue edilerek laktoz indikatör ortamlarına transfer edilmiştir. Bu ortamlarda, asit oluşturmaları sonucu belirgin sarı renk alan koloniler Lac⁺, beyaz koloniler ise Lac⁻ özellikte tanımlanmıştır.

Plazmidlerin İzolasyonu, Saflaştırılması ve Moleküler Büyüklüklerinin Tanımlanması

Plazmid saflaştırılmasında kullanılan örnekler, her suş için 500 mL lik kültürlerden hazırlanmıştır. Plazmid izolasyonunda Anderson ve McKay (15) tarafından önerilen alkali denatürasyon yöntemi kullanılmış ve DNA örnekleri sezyum klorür-etidyum bromid (CsCl-EtBr) yoğunluk gradienti ile saflaştırılmıştır (16). Santrifüj işlemi 40000 devirde 72 saat süreyle ve +4°C' de yapılmıştır. Ultraviyole ışığa tabi tutulan ultrasantrifüj tüplerinden (Polyallomer, 13,5 mL) steril şırıngalar aracılığı ile plazmid bantları alınarak 2 litre Tris-EDTA tamponunda (% 0,37 g EDTA, % 0,21 g tris, pH 7,5) 24 saat dializ edilmiştir. Agaroz jel, % 0,7 agaroz konsantrasyonunda hazırlanmış ve elektroforez işlemi, 100 V elektrik akımı uygulanarak 3 saat süreyle yapılmıştır.

Plazmid büyüklüklerinin saptanmasında; moleküler büyüklükleri bilinen ccc DNA marker' larının (16,2 - 14,1 - 12,1 - 10,1 - 8,0 - 7,0 - 6,0 - 5,0 - 4,0 - 3,0 ve 2,0 kb, Bathesda Research Laboratories, Product No: 5622SA, USA) elektroforetik hareketlilikleri ile büyüklükleri arasındaki doğrusal ilişkiden yararlanılmıştır (17).

Sonuçlar ve Tartışma

Laboratuvara getirilen izolasyon materyallerinden, steril fizyolojik tuzlu su ortamlarında seri dilüsyonlar hazırlanarak neutral red chalk lactose agar (NRCLA) plaklarına sürme ekimler yapılmıştır. NRCLA plakları 30 °C'de 48 saat inkübasyona tabi tutulduktan sonra, tek kolonilerin yoğun bulunduğu petri kutuları seçilmiştir. Laktokoklar, NRCLA besiyeri üzerinde geliştiklerinde; parlak kırmızı renkte koloniler oluşturmakta ve ürettikleri laktik asit ile CaCO₃'ü nötürleştirerek, koloni çevresinde berrak zon meydana getirmektedir (10). NRCLA ortamlarında bu kriterler esas alınarak seçilen kolonilerden; gram pozitif, siferik (kok) morfolojik yapı gösteren, Elliker broth ortamında 45 °C inkübasyon sıcaklığı, % 6,5 oranında NaCl ilavesi (30 °C) ve ortam pH' sının 9,6 düzeyine yükseltilmesi (30 °C) gibi 3 bağımsız koşulda da üreyemeyenler, *Lactococcus* cinsi üyesi olarak tanımlanmıştır.

Lactococcus izolatlarından, *L. lactis* subsp. *lactis* suşlarının tanısında M17 agar' da mannitol fermentasyonu, Reddy agar' da arjinin hidrolizi sonucu amonyak oluşumu ve 40 °C inkübasyon

| Bakteri Kod No | İzolasyon Materyali | Bölge |
|----------------|---------------------|----------------------|
| MCL 1 | Çiğ süt | Trabzon (Işıklar) |
| MCL 2 | Peyniraltı suyu | Trabzon (Işıklar) |
| MCL 3 | Peyniraltı suyu | Konya (Altınova) |
| MCL 4 | Peyniraltı suyu | Nevşehir (Avanos) |
| MCL 5 | Çiğ süt | Bursa (Seydiköy) |
| MCL 6 | Çiğ süt | Antalya (Bozova) |
| MCL 7 | Çiğ süt | Burdur (Varollar) |
| MCL 8 | Peyniraltı suyu | Ordu (Gölköy) |
| MCL 9 | Çiğ süt | Kayseri (Pınarbaşı) |
| MCL 10 | Peyniraltı suyu | Ankara (Kazan) |
| MCL 11 | Peyniraltı suyu | Edirne (Meriç) |
| MCL 12 | Çiğ süt | Edirne (Meriç) |
| MCL 13 | Peyniraltı suyu | Çanakkale (Ezine) |
| MCL 14 | Çiğ süt | Tekirdağ (Muratlı) |
| MCL 15 | Peyniraltı suyu | Sinop (Kargı) |
| MCL 16 | Peyniraltı suyu | Bolu (Gerede) |
| MCL 17 | Peyniraltı suyu | Zonguldak (Kozlu) |
| MCL 18 | Peyniraltı suyu | Ağrı (Patnos) |
| MCL 19 | Peyniraltı suyu | İğdır (Aralık) |
| MCL 20 | Çiğ süt | İğdır (Aralık) |
| MCL 21 | Çiğ süt | Denizli (Çivril) |
| MCL 22 | Peyniraltı suyu | Afyon |
| MCL 23 | Peyniraltı suyu | Afyon |
| MCL 24 | Çiğ süt | Trabzon (Tonya) |
| MCL 25 | Peyniraltı suyu | Trabzon (Tonya) |
| MCL 26 | Çiğ süt | Gümüşhane (Torul) |
| MCL 27 | Çiğ süt | Eskişehir (Çifteler) |
| MCL 28 | Peyniraltı suyu | Eskişehir (Çifteler) |
| MCL 29 | Peyniraltı suyu | Balıkesir (Gönen) |
| MCL 30 | Peyniraltı suyu | Balıkesir (Gönen) |
| MCL 31 | Peyniraltı suyu | Bursa (Seydiköy) |
| MCL 32 | Peyniraltı suyu | Burdur (Varollar) |
| MCL 33 | Çiğ süt | Sinop (Kargı) |
| MCL 34 | Çiğ süt | Çorum (Sungurlu) |
| MCL 35 | Çiğ süt | Uşak (Altıntaş) |
| MCL 36 | Peyniraltı suyu | Niğde (Kemerhisar) |
| MCL 37 | Peyniraltı suyu | Kilis |
| MCL 38 | Çiğ süt | Bilecik |
| MCL 39 | Çiğ süt | İzmir (Ödemiş) |

Tablo 1. Araştırmada kullanılan *L. lactis* subsp. *lactis* suşlarının izolasyon materyalleri ve izolasyon materyallerinin sağlandığı bölgeler.

Tablo 1'in devamı.

| Bakteri Kod No | İzolasyon Materyali | Bölge |
|----------------|---------------------|--------------------|
| MCL 40 | Çiğ süt | Adıyaman (Tut) |
| MCL 41 | Peyniraltı suyu | Adıyaman (Tut) |
| MCL 42 | Çiğ süt | İzmir (Kemalpaşa) |
| MCL 43 | Peyniraltı suyu | İzmir (Kemalpaşa) |
| MCL 44 | Çiğ süt | A.Ü.Z.F. İşletmesi |
| MCL 45 | Çiğ süt | A.O.Ç. (Ankara) |
| MCL 46 | Çiğ süt | Trabzon (Çaykara) |
| MCL 47 | Peyniraltı suyu | Kayseri |
| MCL 48 | Çiğ süt | Ankara (Nallıhan) |
| MCL 49 | Peyniraltı suyu | Antalya (Bozova) |
| MCL 50 | Peyniraltı suyu | Tekirdağ (Muratlı) |

sıcaklığında gelişebilme testleri kullanılmıştır (11, 12). Bu testler sonucunda; mannitolü fermente edemeyen ancak arjininden amonyak oluşturabilen ve 40 °C inkübasyon sıcaklığında gelişebilen koloniler, *L. lactis* subsp. *lactis* suşları olarak tanımlanmıştır. *L. lactis* subsp. *lactis* ile *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*' in ayırımında sitrat fermentasyonu sonucu diasetil ve asetoin oluşumu testi esas alınmıştır. Bu teste negatif sonuç veren tipik *L. lactis* subsp. *lactis* kolonileri çalışma materyali olarak seçilmiş (Tablo 2) ve stok kültürleri hazırlanmıştır.

50 *L. lactis* subsp. *lactis* suşunda yürütülen plazmid izolasyonu ve agaroz jel elektroforezi çalışmaları sonucu, suşların, 1-7 adet arasında değişen, farklı moleküler büyüklüklerde plazmidler içerdiği saptanmıştır (Şekil 2, 3, 4, 5, 6 ve 7). Suşlarda en büyük plazmid 52,0 kb büyüklükte (MCL15 suşu, Şekil 7), en küçük plazmid ise 1,8 kb büyüklükte (MCL26, MCL28, MCL29, MCL40 ve MCL50, Şekil 3) belirlenmiştir. *Lactococcus* cinsi suşları ile yürütülen araştırmalarda, bu bakterilerin genellikle 1-11 adet arasında değişen sayıda plazmid içerikleri saptanmıştır. Plazmid büyüklükleri ise 1-100 kb arasında bulunmuştur (18, 19). Bu araştırmada elde edilen bulgular ile, literatür verileri uygunluk göstermektedir. Diğer yandan, çalışılan 50 suş içerisinde 22 adedinin 1 plazmid içermesi, bu suşların doğal koşullarda değişik plazmidlerini kaybetmiş mutantlar olduğuna işaret etmektedir. Ancak bunun kesinlik kazanabilmesi için, söz konusu suşlarda karşılaştırmalı biyokimyasal ve fizyolojik analizlerin yapılması zorunludur. Zira kriptomik plazmidler yanında bazı metabolik plazmidlerin de kaybının, fenotipik özellikler kullanılarak tanımlanması olanaklı değildir. Bu tip mutantlarda plazmid kaybının geri dönüşüm sıklığı genellikle düşük düzeydedir ve bu olay popülasyondaki bireylerin plazmid içeriklerinde gözlenen değişimlerle tanımlanabilmektedir (20). Çalışma süresince; özellikle tek plazmid içeren suşların popülasyonlarından seçilen çok sayıda koloni ile yürütülen plazmid analizlerinde, böyle bir değişim saptanmamıştır.

Bu durum da söz konusu *L. lactis* subsp. *lactis* suşlarının, ayrı suşlar olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir.

Tablo 2. *L. lactis* subsp. *lactis* suşlarının tanısı.

| Morfolojik, Biokimyasal ve Kültürel Özellikler | Bakteri Kod No. | | | | | | | | |
|---|-----------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | MCL1 | MCL2 | MCL3 | MCL4 | MCL5 | MCL6 | MCL7 | MCL8 | MCL9 |
| Bakteri Morfolojisi | K | K | K | K | K | K | K | K | K |
| Gram Reaksiyonu | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Katalaz Testi | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Arjininden Amonyak Oluşumu | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Sitrat Fermentasyonu | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Mannitol Fermentasyonu | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 30 °C | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Elliker 40 °C | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Broth' ta 45 °C | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Gelişme % 6.5 NaCl-30 °C | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| pH 9.6- 30 °C | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

| Morfolojik, Biokimyasal ve Kültürel Özellikler | Bakteri Kod No. | | | | | | | |
|---|-----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | MCL10 | MCL11 | MCL12 | MCL13 | MCL14 | MCL15 | MCL16 | MCL17 |
| Bakteri Morfolojisi | K | K | K | K | K | K | K | K |
| Gram Reaksiyonu | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Katalaz Testi | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Arjininden Amonyak Oluşumu | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Sitrat Fermentasyonu | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Mannitol Fermentasyonu | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 30 °C | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Elliker 40 °C | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Broth' ta 45 °C | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Gelişme % 6.5 NaCl-30 °C | - | - | - | - | - | - | - | - |
| pH 9.6- 30 °C | - | - | - | - | - | - | - | - |

| Morfolojik, Biokimyasal ve Kültürel Özellikler | Bakteri Kod No. | | | | | | | | |
|---|-----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | MCL18 | MCL19 | MCL20 | MCL21 | MCL22 | MCL23 | MCL24 | MCL25 | MCL26 |
| Bakteri Morfolojisi | K | K | K | K | K | K | K | K | K |
| Gram Reaksiyonu | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Katalaz Testi | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Arjininden Amonyak Oluşumu | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Sitrat Fermentasyonu | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Mannitol Fermentasyonu | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 30 °C | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Elliker 40 °C | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Broth' ta 45 °C | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Gelişme % 6.5 NaCl-30 °C | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| pH 9.6- 30 °C | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

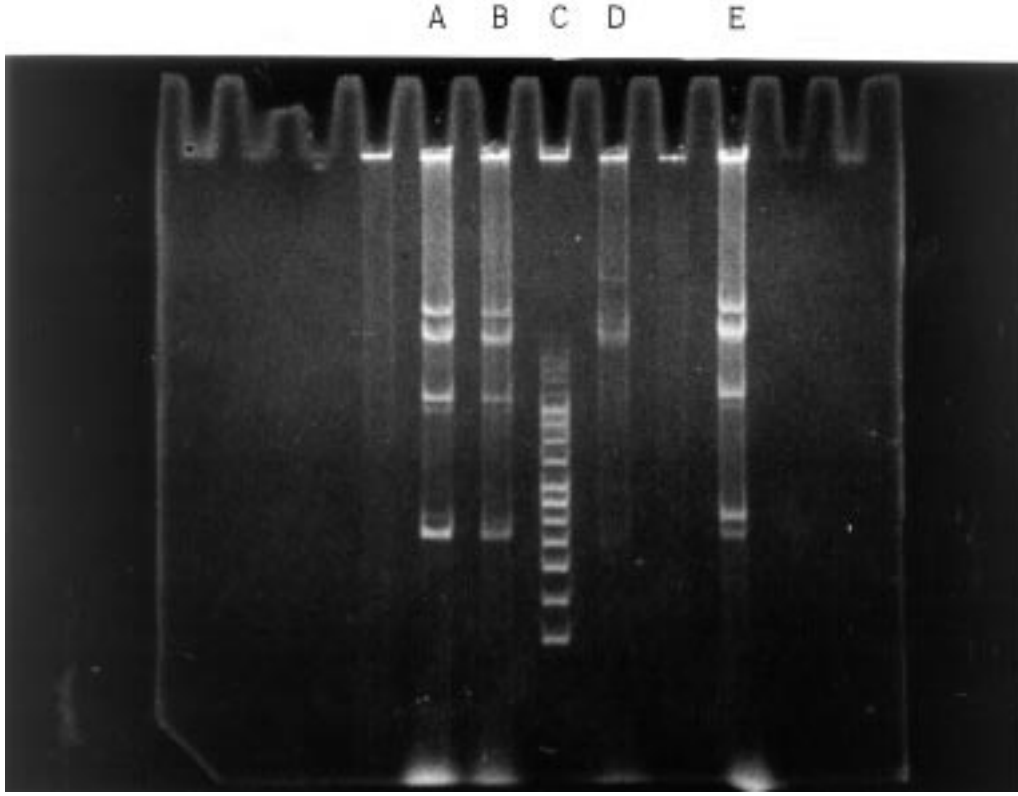
Tablo 2'nin devamı.

| Morfolojik, Biokimyasal ve Kültürel Özellikler | Bakteri Kod No. | | | | | | | |
|---|-----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | MCL27 | MCL28 | MCL29 | MCL30 | MCL31 | MCL32 | MCL33 | MCL34 |
| Bakteri Morfolojisi | K | K | K | K | K | K | K | K |
| Gram Reaksiyonu | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Katalaz Testi | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Arjininden Amonyak Oluşumu | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Sitrat Fermentasyonu | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Mannitol Fermentasyonu | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 30 °C | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Elliker 40 °C | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Broth' ta 45 °C | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Gelişme % 6.5 NaCl-30 °C | - | - | - | - | - | - | - | - |
| pH 9.6- 30 °C | - | - | - | - | - | - | - | - |

| Morfolojik, Biokimyasal ve Kültürel Özellikler | Bakteri Kod No. | | | | | | | | |
|---|-----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | MCL35 | MCL36 | MCL37 | MCL38 | MCL39 | MCL40 | MCL41 | MCL42 | MCL43 |
| Bakteri Morfolojisi | K | K | K | K | K | K | K | K | K |
| Gram Reaksiyonu | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Katalaz Testi | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Arjininden Amonyak Oluşumu | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Sitrat Fermentasyonu | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Mannitol Fermentasyonu | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 30 °C | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Elliker 40 °C | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Broth' ta 45 °C | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Gelişme % 6.5 NaCl-30 °C | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| pH 9.6- 30 °C | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

| Morfolojik, Biokimyasal ve Kültürel Özellikler | Bakteri Kod No. | | | | | | |
|---|-----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | MCL44 | MCL45 | MCL46 | MCL47 | MCL48 | MCL49 | MCL50 |
| Bakteri Morfolojisi | K | K | K | K | K | K | K |
| Gram Reaksiyonu | + | + | + | + | + | + | + |
| Katalaz Testi | - | - | - | - | - | - | - |
| Arjininden Amonyak Oluşumu | + | + | + | + | + | + | + |
| Sitrat Fermentasyonu | - | - | - | - | - | - | - |
| Mannitol Fermentasyonu | - | - | - | - | - | - | - |
| 30 °C | + | + | + | + | + | + | + |
| Elliker 40 °C | + | + | + | + | + | + | + |
| Broth' ta 45 °C | - | - | - | - | - | - | - |
| Gelişme % 6.5 NaCl-30 °C | - | - | - | - | - | - | - |
| pH 9.6- 30 °C | - | - | - | - | - | - | - |

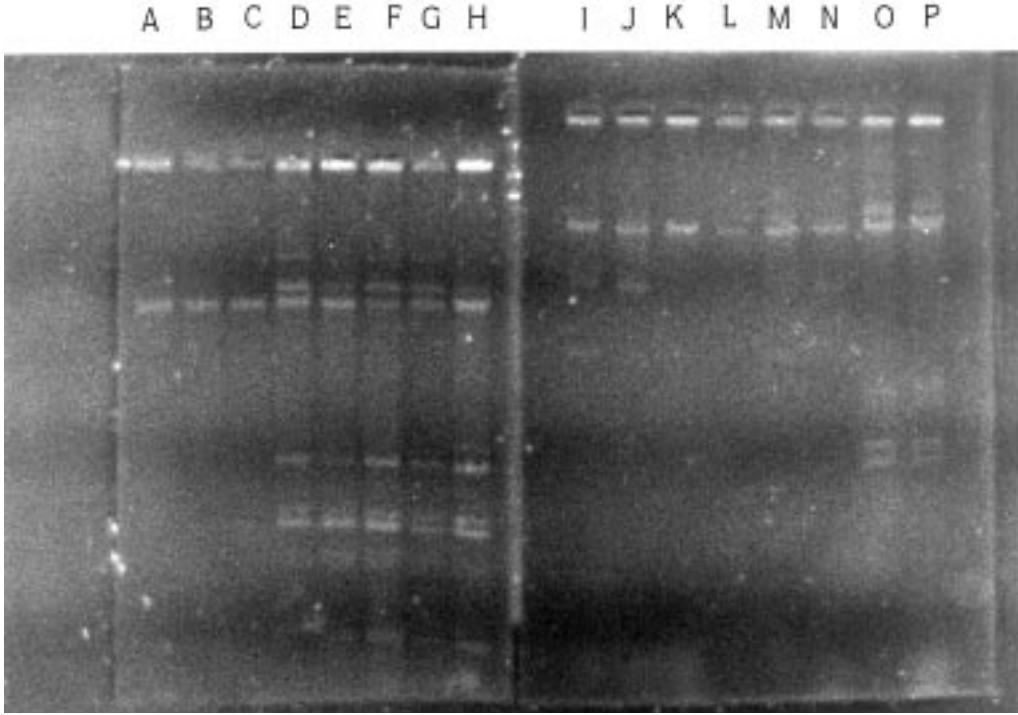
K : Kok,



Şekil 2. *L. lactis* subsp. *lactis* suşlarının plazmid içerikleri.

| MCL39 A-E (kb) | MCL16 B (kb) | ccc* DNA Marker C (kb) | MCL18 D (kb) |
|----------------------|--------------------|---------------------------------|--------------------|
| 33,0 | 33,0 | 16,2 | 38,5 |
| 27,8 | 27,8 | 14,1 | 31,4 |
| 17,4 | 17,4 | 12,2 | 27,4 |
| 16,3 | 16,3 | 10,2 | |
| 6,0 | 6,0 | 8,0 | |
| 5,2 | 5,2 | 7,2 | |
| | | 6,0 | |
| | | 5,0 | |
| | | 4,0 | |
| | | 2,9 | |
| | | 2,1 | |

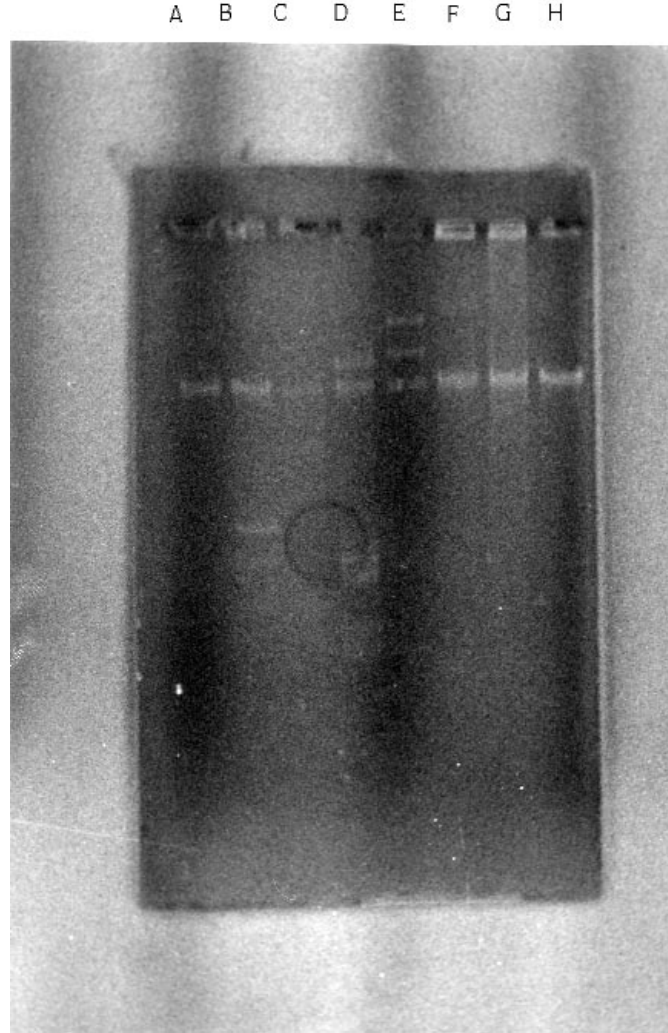
* BRL Chem. Co., USA



Şekil 3. *L. lactis* subsp. *lactis* suşlarının plazmid içerikleri.

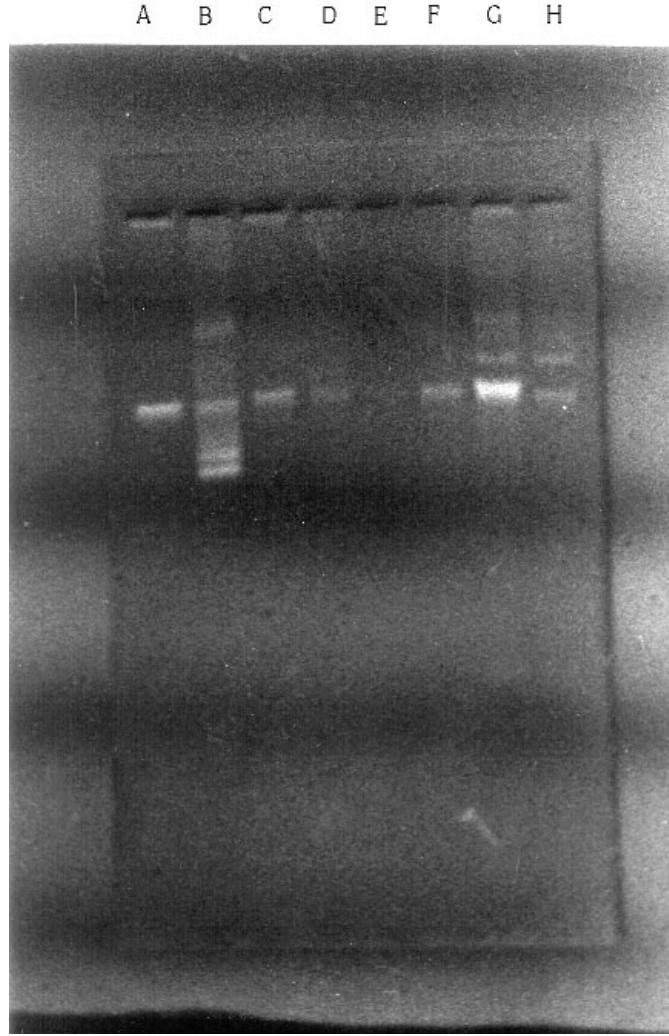
| MCL23 A (kb) | MCL8 B (kb) | MCL2 C (kb) | MCL40 D (kb) | MCL28 E (kb) | MCL29 F (kb) | MCL50 G (kb) | MCL26 H (kb) | MCL1 I (kb) | MCL9 J (kb) | MCL17 K (kb) | MCL13 L (kb) | MCL44 M (kb) | MCL45 N (kb) | MCL24 O (kb) | MCL36 P (kb) |
|--------------------|-------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 33,0 | 33,0 | 33,0 | 45,0 | 37,2 | 45,0 | 45,0 | 37,2 | 33,0 | 33,0 | 33,0 | 33,0 | 33,0 | 33,0 | 37,0 | 37,0 |
| | | 37,2 | 33,0 | 37,2 | 37,2 | 33,0 | 20,2 | 20,2 | | | | 20,2 | 33,0 | 33,0 | |
| | | 33,0 | 8,4 | 33,0 | 33,0 | 10,2 | | | | | | | 5,6 | 5,6 | |
| | | 8,4 | 3,6 | 8,4 | 8,4 | 8,4 | | | | | | | 5,0 | 5,0 | |
| | | 4,4 | 1,8 | 4,4 | 4,4 | 4,4 | | | | | | | | | |
| | | 3,6 | | 3,6 | 3,6 | 3,6 | | | | | | | | | |
| | | 1,8 | | 1,8 | 1,8 | 1,8 | | | | | | | | | |

Plazmid içerikleri tanımlanan suşların sınıflandırılmasında plazmid profillerindeki uyuşma esas alınmıştır. 50 suş içerisinde plazmid sayısı ve büyüklükleri tamamen aynı olan ve 2 ya da daha fazla suş içeren 9 grup oluşturulmuştur. Bir ya da daha fazla plazmid içeriği bakımından diğer gruplarla farklılık gösteren suşlar ise değişik ekotipler olarak değerlendirilmiş ve bunlara da, daha sonra yapılacak izolasyon ve tanımlama çalışmalarından elde olunacak veriler doğrultusunda yeni üyelerin katılabileceği göz önünde bulundurularak, farklı grup adları verilmiştir (Tablo 3).



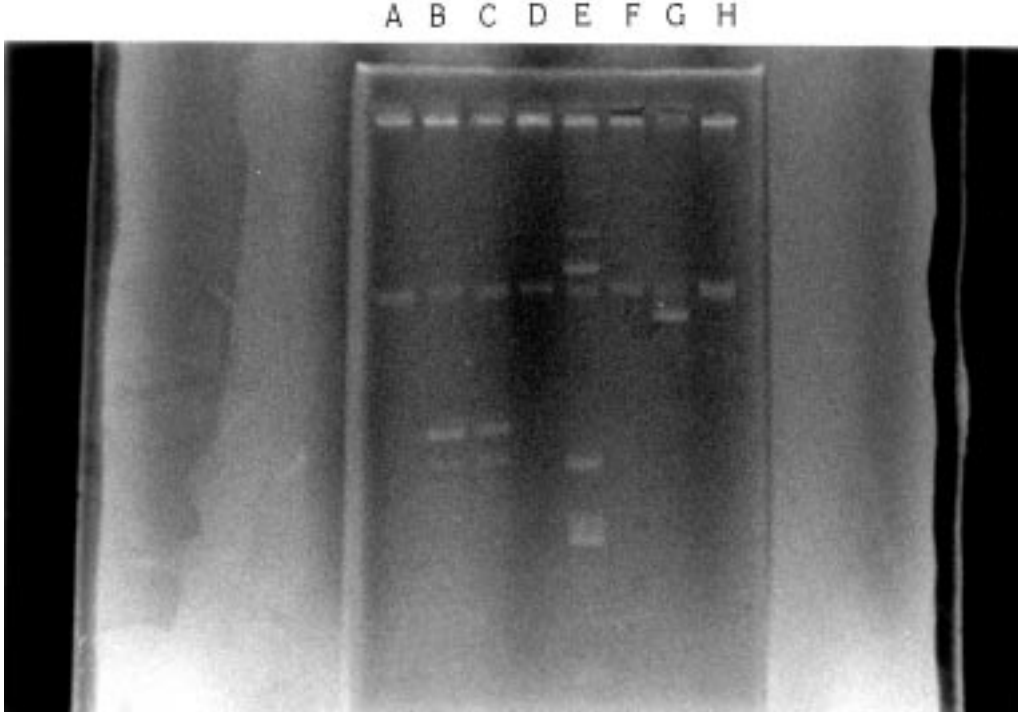
Şekil 4. *L. lactis* subsp. *lactis* suşlarının plazmid içerikleri.

| MCL49 A (kb) | MCL37 B (kb) | MCL2 C (kb) | MCL5 D (kb) | MCL20 E (kb) | MCL7 F (kb) | MCL30 G (kb) | MCL21 H (kb) |
|--------------------|--------------------|-----------------------------------|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|--------------------|
| 33,0 10,6 | 33,0 | 33,0 33,0 8,2 5,6 3,8 | 36,2 33,0 | 42,0 | 33,0 | 33,0 | 33,0 |



Şekil 5. *L. lactis* subsp. *lactis* suşlarının plazmid içerikleri.

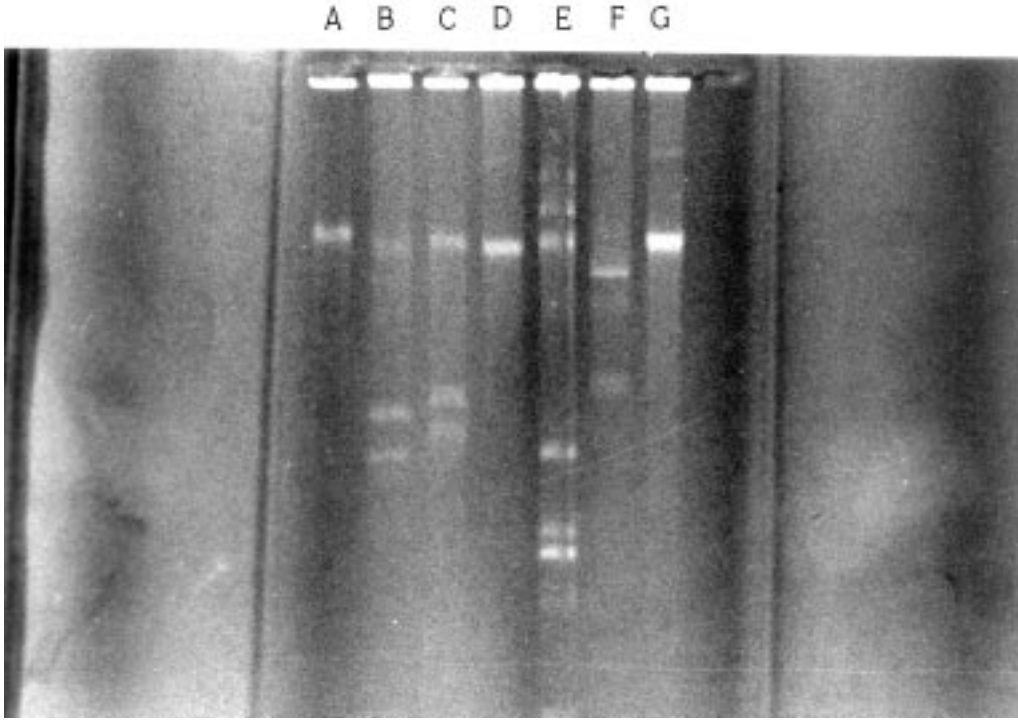
| MCL47 A (kb) | MCL4 B (kb) | MCL25 C (kb) | MCL31 D (kb) | MCL32 E (kb) | MCL43 F (kb) | MCL41 G (kb) | MCL34 H (kb) |
|--------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 38,5 | 48,0 | 38,5 | 38,5 | 38,5 | 38,5 | 48,0 | 48,0 |
| | 38,5 | | | | | 45,2 | 45,2 |
| | 32,0 | | | | | 42,3 | 42,3 |
| | 30,2 | | | | | 38,5 | 38,5 |



Şekil 6. *L. lactis* subsp. *lactis* suşlarının plazmid içerikleri.

| MCL6 A (kb) | MCL22 B (kb) | MCL11 C (kb) | MCL14 D (kb) | MCL19 E (kb) | MCL42 F (kb) | MCL35 G (kb) | MCL27 H (kb) |
|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 20,1 | 29,1 | 29,1 | 29,1 | 38,2 | 29,1 | 29,1 | 29,1 |
| | 6,1 | 6,1 | | 32,5 | | 26,3 | |
| | 5,2 | 5,2 | | 29,1 | | | |
| | | | | 5,2 | | | |
| | | | | 2,8 | | | |
| | | | | 2,4 | | | |

Lactococcus cinsi üyelerinde saptanan stabil plazmid profilleri, belirli bir türe ya da alt türe ait suşların ayırımında en yaygın olarak kullanılan kriterlerin başında gelmektedir. Türler ya da alt türler ve biyovaryeteler arasında yapılan genetik tanımlamalarda ise, kromozomal DNA ya da ribozomal RNA'e (rRNA) spesifik sondaların geliştirilmesi ve kullanımı esas alınmaktadır (19). Bu araştırma kapsamında da yalnız *L. lactis* subsp. *lactis* suşları tanımlandığı için, plazmid içeriklerindeki uyuma temel alınarak yapılan suş ayırımı, kültür koleksiyonlarında kullanılacak niteliktedir. Oluşturulan gruplar, bugüne kadar laboratuvarımızda tanımlanan diğer *L. lactis* subsp. *lactis* suşlarının plazmid içerikleri ve belirlenen metabolik özellikleri ile karşılaştırmak



Şekil 7. *L. lactis* subsp. *lactis* suşlarının plazmid içerikleri.

| MCL33 A (kb) | MCL38 B (kb) | MCL46 C (kb) | MCL48 D (kb) | MCL3 E (kb) | MCL10 F (kb) | MCL15 G (kb) |
|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|--------------------|--------------------|
| 36,4 | 35,0 | 35,0 | 35,0 | 48,2 | 31,0 | 52,0 |
| | 11,5 | 12,4 | | 44,1 | 26,3 | 35,0 |
| | 8,0 | 8,8 | | 35,0 | | |
| | | | | 8,2 | | |
| | | | | 3,6 | | |
| | | | | 2,8 | | |

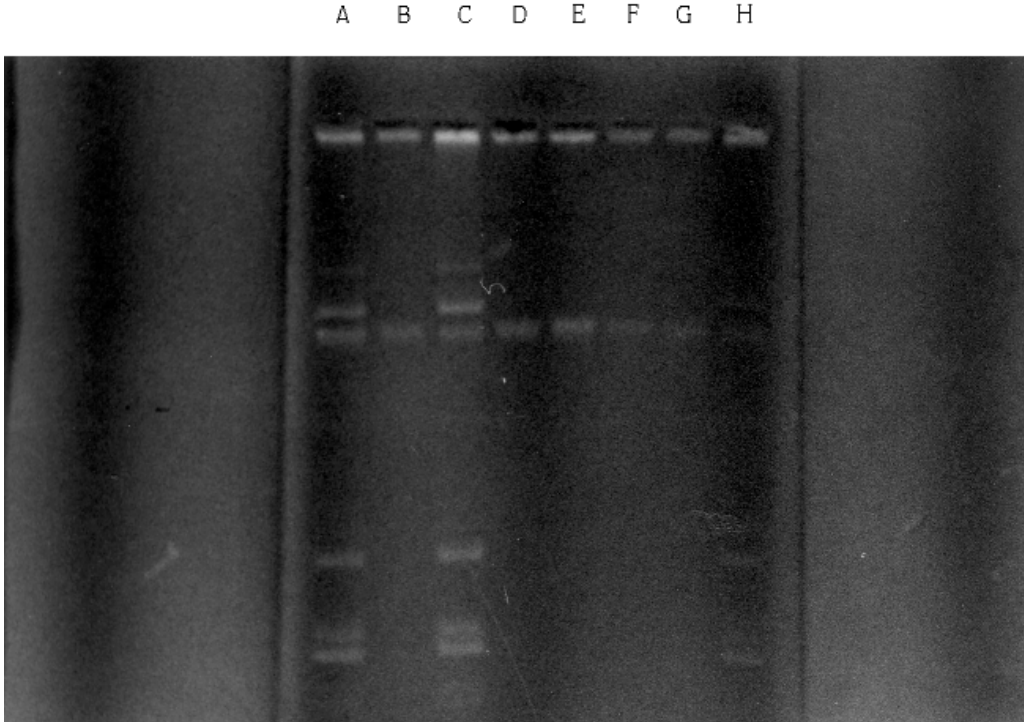
suretiyle genişletilecek ve kültür koleksiyonlarında, suş düzeyinde ayırımın temelini teşkil edecektir.

L. lactis subsp. *lactis* suşlarında laktik asit fermentasyonu (Lac⁺) özelliğini determine eden plazmidlerin belirlenmesinde; akriflavin (40 µg/mL) uygulamasından sonra, laktoz indikatör agar ortamlarında tanımlanan Lac⁺ ve Lac⁻ (laktik asit fermentasyonu özelliğini kaybetmiş) mutantların plazmid profillerinden yararlanılmıştır. Bu denemelerde, belirli bir plazmidin

Tablo 3. *L. lactis* subsp. *lactis* suşlarının plazmid içeriklerindeki uyuşmaya göre gruplandırılması.

| Grup No. | Bakteri Kod No. | Plazmid İçerikleri (kb) |
|----------|---|--------------------------------|
| 1 | MCL16, MCL39 | 33,0-27,8-17,4-16,3-6,0-5,2 |
| 2 | MCL18 | 38,5-31,4-27,4 |
| 3 | MCL2, MCL7, MCL8, MCL12, MCL13, MCL17, MCL21, MCL23, MCL30, MCL44, MCL49 | 33,0 |
| 4 | MCL29, MCL40, MCL50 | 45,0-37,2-33,0-8,4-4,4-3,6-1,8 |
| 5 | MCL28 | 37,2-33,0-8,4-3,6-1,8 |
| 6 | MCL26 | 37,2-33,0-10,2-8,4-4,4-3,6-1,8 |
| 7 | MCL1, MCL9, MCL45 | 33,0-20,2 |
| 8 | MCL24, MCL36 | 37,0-33,0-5,6-5,0 |
| 9 | MCL37 | 33,0-10,6 |
| 10 | MCL5 | 36,2-33,0-8,2-5,6-3,8 |
| 11 | MCL20 | 42,0-37,3-33,0 |
| 12 | MCL25, MCL31, MCL32, MCL43, MCL47 | 38,5 |
| 13 | MCL4 | 48,0-38,5-32,0-30,2 |
| 14 | MCL34, MCL41 | 48,0-45,2-42,3-38,5 |
| 15 | MCL6, MCL14, MCL27, MCL42 | 29,1 |
| 16 | MCL11, MCL22 | 29,1- 6,1-5,2 |
| 17 | MCL19 | 38,2-32,5-29,1-5,2-2,8-2,4 |
| 18 | MCL35 | 29,1-26,3 |
| 19 | MCL33 | 36,4 |
| 20 | MCL38 | 35,0-11,5-8,0 |
| 21 | MCL46 | 35,0-12,4-8,8 |
| 22 | MCL48 | 35,0 |
| 23 | MCL3 | 48,2-44,1-35,0-8,2-3,6-2,8 |
| 24 | MCL10 | 31,0-26,3 |
| 25 | MCL15 | 52,0-35,0 |

varlığında ya da yokluğunda laktik asit fermentasyonu özelliği tanımlanabilen (Lac^+ ya da Lac^-) mutantlar esas alınmıştır. Eğer suşlara akriflavin muamele edilerek seçilen birinci kuşak mutantlarda Lac^- ya da Lac^+ fenotiplerin kaybolan ya da kalan plazmidleri, laktik asit fermentasyonu özelliğinin plazmid doğasını belirlemede yetersiz ise; bu mutantlarla, tekrar 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ olacak şekilde akriflavin uygulanarak, mutant seçme denemelerine devam edilmiştir. Bu şekilde, bazı suşlar için ikinci ve üçüncü kuşak mutantlar oluşturulmuştur. Sonuçta her bir suşun, içerdiği ya da kaybettiği bir tek plazmidi ile laktik asit fermentasyonu özelliğini sürdüren ya da bu özelliği kaybeden mutantlarında laktoz plazmidlerinin tanısı yapılmıştır (Şekil 8 ve 9). Tek bir plazmid içeren *L. lactis* subsp. *lactis* suşlarında ise, bu suşların laktoz indikatör agar ortamlarında

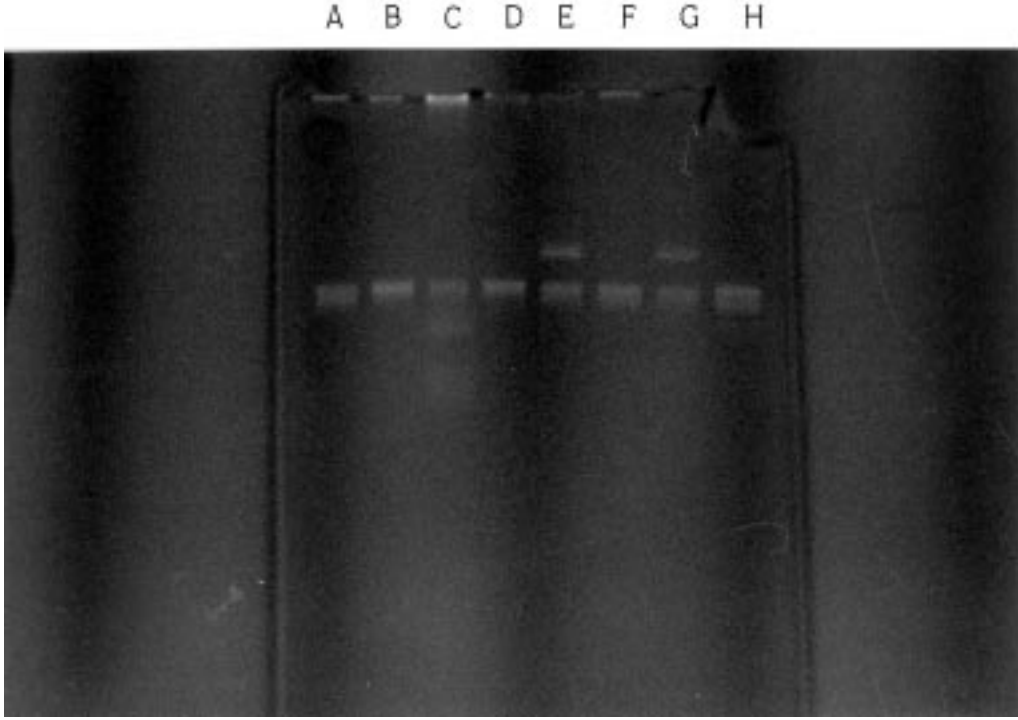


Şekil 8. *L. lactis* subsp. *lactis* MCL19 suşu ve laktoz fermentasyonu özelliğini sürdüren mutantlarının plazmid içerikleri.

| MCL 19 A-C (Doğal suş, kb) | MCL 19-11 B-D-E-F-G (Mutant, kb) | MCL 19-2 H (Mutant, kb) |
|----------------------------------|--|-------------------------------|
| 38,2 | 29,1 | 32,5 |
| 32,5 | | 29,1 |
| 29,1 | | 5,2 |
| 5,2 | | 2,4 |
| 2,8 | | |
| 2,4 | | |

seçilen Lac⁻ mutantlarında yürütülen plazmid analizleri ile laktoz plazmidleri tanımlanmıştır (Şekil 10).

Mutant seçme ve plazmid analizi çalışmalarından elde olunan bulgulardan hareketle; laktik asit fermentasyonu özelliğini determine eden plazmidlerin moleküler büyüklüklerindeki uyuşmaya göre, *L. lactis* subsp. *lactis* suşları 6 grup altında toplanmıştır (Tablo 4). Bu gruplar içerisinde, yalnız 36,4 kb büyüklükteki plazmid ile tanımlanan 5 No. lu grup ve 26,3 kb



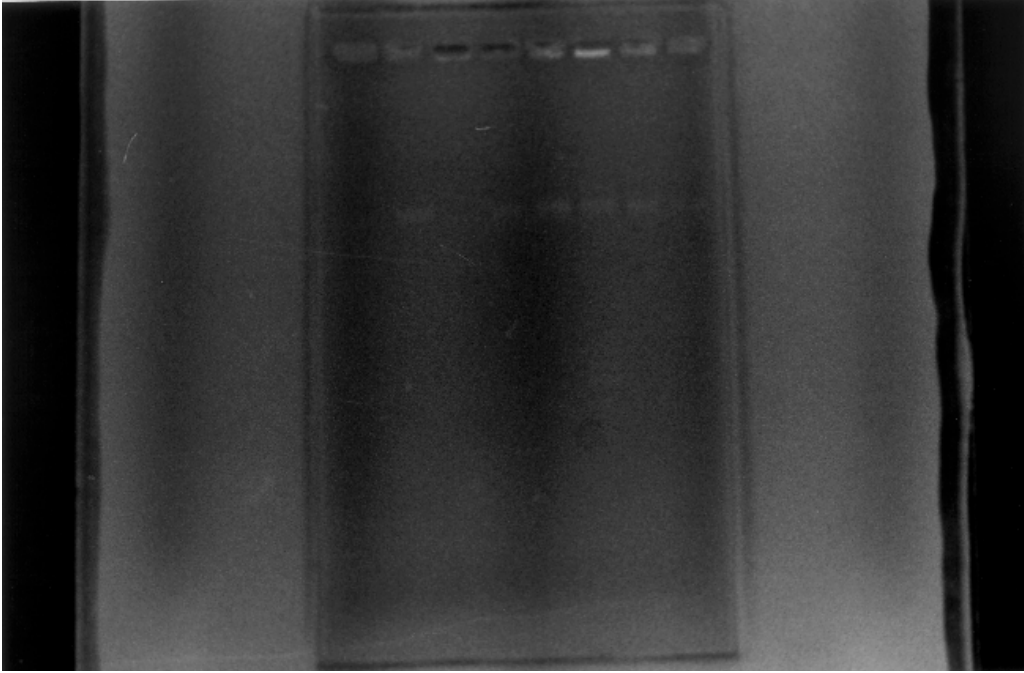
Şekil 9. *L. lactis* subsp. *lactis* MCL35 suşu ve laktoz fermentasyonu özelliğini kaybeden mutantının plazmid içerikleri.

| MCL35-48 A-B-C-D-F-H (Mutant, kb) | MCL35 E-G (Doğal suş, kb) |
|---|---------------------------------|
| 26,3 | 29,1 26,3 |

büyükteki plazmid ile tanımlanan 4 No. lu grup birer suş içermekteydi. Birden fazla suş içeren diğer dört grup içerisinde en kalabalık grup ise, 33,0 kb'lık plazmid ile tanımlanan 1 No. lu grup (26 suş) olmuştur. Suşlarda en büyük laktoz plazmid MCL4, MCL18, MCL25, MCL31, MCL32, MCL34, MCL41, MCL43 ve MCL47 suşlarının (grup2) içerdiği 38,5 kb büyüklükteki plazmid iken, en küçük laktoz plazmid ise MCL10 (grup 4) suşunda tanımlanan 26,3 kb büyüklükteki plazmid olarak belirlenmiştir.

Lactococcus cinsi üyesi bakterilerde laktik asit fermentasyonu özelliğini belirleyen plazmidler, genellikle bu bakterilerin içerdiği 20 kb' dan büyük plazmidlerdir. Bugüne kadar değişik suşlarla yürütülen araştırmalarda, laktokok suşlarındaki laktoz plazmidlerinin büyüklükleri 25-60 kb arasında saptanmıştır (6, 20, 21). Türkiye kökenli *L. lactis* subsp. *lactis* suşlarının plazmid

A B C D E F G



Şekil 10. MCL33 suşu ve laktoz fermentasyonu özelliğini kaybeden mutantının plazmid içerikleri.

| | |
|---|------------------------------|
| MCL33 A-C-D-E-F-G (Doğal suş. kb) | MCL33-7 B (Mutant. kb) |
| 36.4 | - |

büyüklikleri de, literatür verilerinde tanımlanan sınırlar içerisinde bulunmuştur. Bazı araştırmacılar, değişik *L. lactis* subsp. *lactis* ve *L. lactis* subsp. *cremoris* suşlarında 95 kb büyüklüğe kadar ulaşabilen laktoz plazmidlerini tanımlamıştır. Ancak söz konusu plazmidlerin genetik analizleri sonucu; bu büyük moleküllerin, iki farklı plazmidin birleşmesi ile oluştuğu belirlenmiştir. Laktoz plazmidini ile birleşen plazmidler nadiren stabil entegrasyon yapıları oluşturabilmekte, çoğu kez birleşmenin kısa bir süresi sonunda yeniden ayrılma meydana gelmektedir (7, 22, 23, 24). Bu araştırmada 50 suş için tanımlanan tüm laktoz plazmidleri 40 kb altında bulunmuştur. Laktokoklarda birleşik plazmidlerin genellikle 60 kb ve yukarısı moleküler büyüklüklerde plazmidler olduğu göz önünde bulundurulur ise; araştırmada tanımlanan plazmidlerin diğer plazmidlerle herhangi bir entegrasyon sürecine katılmadığı söylenebilir. Bununla beraber, kesin kanıtlar için plazmid moleküllerinin DNA hibridizasyonu ve restriksiyon endonukleaz analizlerine gereksinim vardır.

Plazmid büyüklükleri tamamen çakışan tüm suşların (Tablo 3), aynı moleküler büyüklükte laktoz plazmidine sahip olduğu belirlenmiştir (Tablo 4). Bu bulgu; *Lactococcus* cinsi üyelerinin, plazmid profilleri esas alınarak suş düzeyinde ayırımının güvenilirliğini destekleyen önemli bir delildir. Diğer yandan plazmid içerikleri çakışmayan bazı suşlarda ortak büyüklüklerde laktoz plazmidlerinin saptanmasının, bu suşların evrimi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Tablo 4. *L. lactis* subsp. *lactis* suşlarının laktik asit fermentasyonu özelliğini (Lac⁺) determine eden plazmidlerin büyüklüklerindeki uyumaya göre sınıflandırılması.

| Grup No. | Bakteri Kod No. | Laktoz Plazmidi (kb) |
|----------|---|----------------------|
| 1 | MCL1, MCL2, MCL5, MCL7, MCL8, MCL9, MCL12, MCL13, MCL16, MCL17, MCL20, MCL21, MCL23, MCL24, MCL26, MCL28, MCL29, MCL30, MCL36, MCL37, MCL39, MCL40, MCL44, MCL45, MCL49, MCL50 | 33,0 |
| 2 | MCL4, MCL18, MCL25, MCL31, MCL32, MCL34, MCL41, MCL43, MCL47 | 38,5 |
| 3 | MCL6, MCL11, MCL14, MCL19, MCL22, MCL27, MCL35, MCL42 | 29,1 |
| 4 | MCL10 | 26,3 |
| 5 | MCL33 | 36,4 |
| 6 | MCL3, MCL15, MCL38, MCL46, MCL48 | 35,0 |

Teşekkür

Bu çalışma "Türkiye' de İzole Edilen *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Suşlarında Laktoz Fermentasyon Yeteneğinin Genetik Determinantlarının, Konjugal Aktarımının ve Stabilitésinin Tanımlanması" adlı Yüksek Lisans Tezinin Bir bölümüdür. Yönlendirici katkılarından dolayı Prof. Dr. M. Lütfü ÇAKMAKÇI (Süleyman Demirel Üniv.) ve Prof. Dr. Cumhur ÇÖKMÜŞ'e (Ankara Üniv. Fen Fak.) teşekkür ederiz.

Kaynaklar

1. Maeda, S., Gasson, M. Cloning Expression And Location of the *Streptococcus lactis* Gene for Phospho- β -Galactosidase. J. General. Microbiol. 132: 331-340, 1986.
2. De Vos, W.M., Simmons, G. Molecular Cloning of Lactose Genes In Dairy Lactic Streptococci: The Phospho- β -Galactosidase Genes And Their Expression Products. Biochemie, 70: 461-473, 1988.
3. Venema, G. Molecular Biology And Genetic Modification of Lactococci. J. Dairy Sci. 76: 2133-2144, 1993.
4. Kok, J. Inducible Gene Expression And Environmentally Regulated Genes In Lactic Acid Bacteria. Antonie van Leeuwen. 70: 129-145, 1996.
5. Liu, C.Q., Dunn, N.W., Duan, K. Cloning And Sequence Analysis of a Plasmid Replicon From *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FG2. J. Gen. Microbiol. 43: 75-80, 1997.

6. Akçelik, M. The Conjugal Plasmid pII10236 Encodes Lactose Fermentation Ability, Restriction Modification Activity And Bacteriocin Production And Immunity In *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LL102. Food Microbiology 16: 487-494, 1999.
7. Mayer, H., Deixler, W.E., Bertsch, W. Plasmid Profiles of Mesophilic Lactic Acid Bacteria. Milchwirtschaftliche Ber. 114; 3-12, 1993.
8. Morita, H., Kamizono, K., Nakamura, S., Fujita, Y., Sakata, R., Nagata, Y. A. McKay, L.L. Cloning of Citrate Permease Gene of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* N-7 And Expression In Citrate-Negative Lactococci. Milchwissenschaft, 52; 138-141, 1997.
9. Platteuw, C., Hugenholtz, J., Starrenburg, M., Alen-Boerritger, I., De Vos, W.M. Metabolic Engineering Of *Lactococcus lactis*: Influence of The Overproduction of α -Acetolactate Synthase In Strains Deficient In Lactate Dehydrogenase as a Function Of Culture Conditions. Appl. Environ. Microbiol. 61;3967-3971, 1995.
10. Harrigan, F.W., McCance, E.M. Laboratory Methods In Microbiology. Academic Press London, New York, 285s, 1966.
11. Huggins, R.A. Progress In Dairy Starter Culture Technology. Food Technology, 38: 41-50, 1984.
12. Holt, G.H., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., Williams, S.T. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Williams and Wilkins Co., Ninth Edition, 787 p., 1994.
13. McKay, L.L., Baldwin, K.A., Zottola, E.A. Loss of Lactose Metabolism In Lactic Streptococci. Appl. Microbiol. 23(6): 1090-1096, 1972.
14. Terzaghi, B.E., Sandine, W.E. Improved Medium For Lactic Streptococci And Their Bacteriophages. Appl. Microbiol. 29(6): 807-813, 1975.
15. Anderson, D.G., McKay, L.L. A Simple And Rapid Method For Isolating Large Plasmid DNA From Lactic Streptococci. Appl. Environ. Microbiol. 46: 549-552, 1983.
16. Klaenhammer, T.R., McKay, L.L., Baldwin, K.A. Improved Lysis of Group N Streptococci for Isolating And Rapid Characterization of Plasmid DNA. Appl. Environ. Microbiol. 35: 592-600, 1978.
17. Southern, E.M. Measurement of DNA Lengths by Gel Electrophoresis. Analytical Biochemistry, 100: 319-323, 1979.
18. Lucey, M., Daly, C., Fitzgerald, G. Relationship Between *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 952, And Industrial Lactococcal Starter Culture And Strains 712, ML3 and C2. J. Appl. Bacteriol. 75(4); 326-335, 1993.
19. Beimfohr, C., Ludwig, W., Schleifer, K.H. Rapid Genotypic Differentiation of *Lactococcus lactis* Subspecies And Biovar. System. Appl. Microbiol. 20: 216-221, 1993.
20. Leewatcharamas, V., Chia, L.G., Charoenchai, P., Kunajakr, N., Liu, C., Dunn, N.W. Plasmid-Encoded Copper Resistance In *Lactococcus lactis*. Biotechnology Letters, 19: 639-643, 1997.
21. Akçelik, M. Plasmid Mediated Industrial Traits In *L. lactis* subsp. *lactis* LL140. Milchwissenschaft, 54; 603-606, 1999.

22. Feirtag, J.M., Petzel, J.P., Pasalados, E., Baldwin, K.A., McKay, L.L. Thermosensitive Plasmid Replication, Temperature-Sensitive Host Growth, And Chromosomal Plasmid Integration Conferred by *Lactococcus Lactis* subsp. *cremoris* Lactose Plasmids In *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Appl. Environ. Microbiol. 57(2): 539-548, 1991.
23. Godon, J.J., Jury, K.L., Shaerman, C.A., Gasson, M.J. The *Lactococcus lactis* Sex-Factor Aggregation Gene Clu A. Mol. Microbiol. 12: 655-663, 1994.
24. Kranenburg, V., De Vos, W.M. Characterization of Multiple Regions Involved In Replication And Mobilization of Plasmid pNZ4000 Coding For Exopolysaccharide Production In *Lactococcus lactis*. J. Bacteriol. 18: 5285-5290, 1998.