

***Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 'un Klasik ve Moleküler Yöntemler Kullanılarak Tanımlanması ve Karakterizasyonu¹**

Remziye Yılmaz² , Ayhan Temiz³

1. Giriş

Laktik asit bakterileri, laktozu fermente ederek temelde laktik asit oluşturmalarıyla karakterize, Gram pozitif ve katalaz negatif bakterilerdir. Homofermentatif laktik asit bakterileri fermente ürün olarak yalnızca laktik asit oluştururken, heterofermentatif tipler laktik asidin yanısıra etil alkol ve karbon dioksit ile asetat, format ve süksinat oluşturmaktadır. Genel olarak laktik asit bakterileri grubunda *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* ve *Leuconostoc* cinsleri incelenmekte iken son yıllarda yapılan genetik çalışmalar sonucu *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Weissella* ve *Vagococcus* cinsleri de bu grupta incelenmeye başlanmıştır. Yine son yıllara ait literatürde bu grupta *Aerococcus*, *Oenococcus*, *Atopobium*, *Dolosigranum*, *Tetragenococcus*, *Alloiococcus* ve *Gemella* gibi yeni cins isimlerine rastlanmakta ise de bu cinslerle ilgili taksonomik çalışmaların henüz tamamlanmadığı bildirilmektedir (1,2,3). Morfolojik, fizyolojik, ve biyokimyasal özellikleri açısından farklılıkları ortaya konulan *Lactobacillus*, *Leuconostoc* ve *Pediococcus* cinsleri ve bunlara ait suşlar arasında dahi genetik taksonomi çalışmaları ilerledikçe oldukça karışık bir görünüm ortaya çıktığı bildirilmektedir (4). Laktik asit bakterileri Gram pozitif bakteriler içerisinde düşük düzeyde guanin ve sitozin (G+C) oranına sahip olan bir bakteri grubudur (5) ve bu grup içinde yer alan bakterilerin genom büyüklükleri genel olarak 1.8-3.4 Mbp arasında değişmektedir (6).

Laktik asit bakterileri gıda teknolojisi açısından büyük bir öneme sahiptir. Üretimine katıldıkları gıdalarda aroma ve tekstürün oluşumundan sorumlu oldukları gibi kontamine oldukları bazı gıdalarda bozulmalara da neden olabilmektedirler. Diğer taraftan gıdalarda bazı patojenlerin gelişimini inhibe edebilme özelliklerinden dolayı da insan sağlığı açısından ayrı bir öneme sahiptirler (2). *Streptococcus* ve *Lactobacillus* lar gıda teknolojisinde starter kültür olarak geniş bir kullanım alanı bulmaları ve son yıllarda yapılan genetik çalışmalar sonucu sınıflandırılmalarında

¹ Bu çalışma; Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim dalında Prof. Dr. Ayhan Temiz danışmanlığı altında Remziye Yılmaz tarafından yapılan ve 2002 yılında tamamlanan "*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 'un Klasik ve Moleküler Yöntemler Kullanılarak Tanımlanması ve Karakterizasyonu" adlı Doktora tezinin literatür özeti bölümüdür.

² Dr., Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Ankara İl Kontrol Laboratuvarı, Yenimahalle, Ankara

³Prof. Dr., Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Beytepe Ankara. Yazışmalardan sorumlu yazar. e-posta : temiz@hacettepe.edu.tr

ortaya çıkan karışıklıklar gibi nedenlerle üzerinde yoğun olarak durulan ve araştırma konusu olmaya devam eden laktik asit bakterileridir (1,2, 7).

Streptococcus thermophilus (*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*) ve *Lactobacillus bulgaricus* (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) genelde yoğurt starter bakterileri olarak kullanılan ve yoğurt üretiminden sorumlu olan laktik asit bakterileridir.

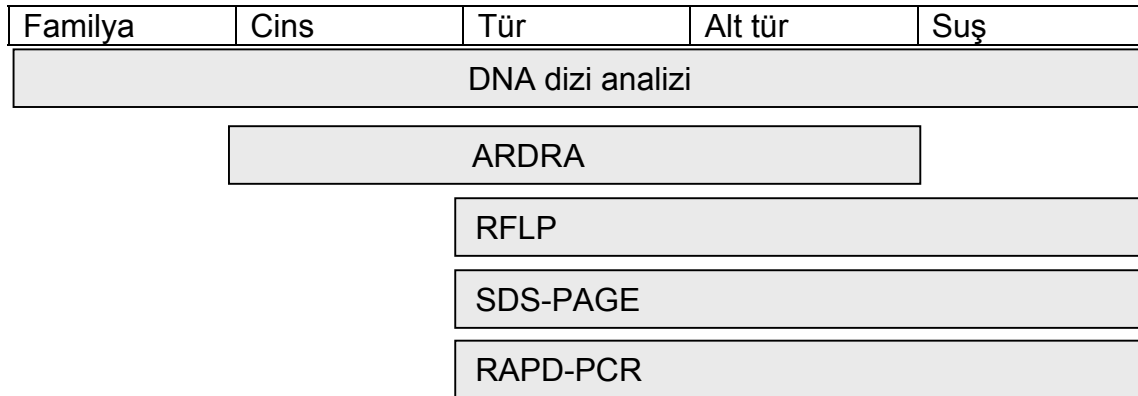
Streptococcus cinsindeki türler küresel ve oval morfolojiye sahip, Gram pozitif, katalaz negatif ve genellikle hareketsiz bakterilerdir. *Streptococcus* cinsi son Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (8)'de piyojenik, oral, enterokok, laktik ve diğer streptokoklar olmak üzere beş gruba ayrılmıştır. *Streptococcus thermophilus* diğer streptokoklar grubunda ele alınmıştır. Farrow ve Collins (9), DNA-DNA homoloji değerleri üzerine yapılan bir çalışmayı dikkate alarak *S. thermophilus*'un üç adet alt tür içeren *Streptococcus salivarius* türüne ait bir alt tür olduğunu belirtmişler ve adının *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* olarak değiştirilmesini önermişlerdir (8,10).

S. thermophilus (*S. salivarius* subsp. *thermophilus*) homofermentatiftir ve 45-52 °C'lerde gelişebilmektedir (1). Optimum gelişme pH'sı 6.0 - 6.5 olup aerobik ve fakültatif anaerob özellik göstermektedir. DNA'sındaki G+C içeriği % 37-40 mol'dür. Proteolitik aktivitesi zayıftır (1,11,12). *S. thermophilus*'un genom büyüklüğü 1.75 ile 1.82 Mbp arasında değişmektedir (6). *S. thermophilus*, suşlar arası farklılıklar olmakla birlikte plazmit varlığı açısından diğer laktik asit bakterilerine göre daha zayıftır (13). Birçok *S. thermophilus* suşunda plazmit varlığı saptanamazken, plazmit varlığı saptananlarda da bunların küçük oldukları belirlenmiştir (6). Bu plazmitlerin bakterinin karbohidratları kullanma yetenekleri ve antibiyotiklere karşı direnç profilleri üzerine etkileri olmamalarına karşın morfolojisi, fajlara karşı direnç mekanizmaları ve sütü koagüle etme yeteneği üzerine etkili olduğu saptanmıştır (13). Son yıllarda gerçekleştirilen bazı araştırmalarda ise bu bakterinin antibiyotik direnç profili üzerine etkili olan plazmit varlığına sahip olduğu da kaydedilmektedir (6).

Lactobacillus cinsi bakteriler ise düz ya da hafif kıvrık çubuk şekilli bir morfolojiye sahiptir. Hücreleri tek tek ya da zincir şeklinde bulunur. Gram-pozitif, katalaz negatif, anaerobik, mikroaerofilik ya da fakültatif anaerobiktirler. *Lactobacillus* biyokimyasal ve fizyolojik özellikleri açısından oldukça fazla çeşitlilik içeren üyelere sahip bir cinstir. Beslenme istekleri de oldukça kompleksdir. *Lactobacillus* cinsinin önemli bir üyesi olan *Lactobacillus bulgaricus*, Weiss ve ark.(14)'nın önerisiyle *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ismiyle anılmaya başlanmıştır (8,10). *L. bulgaricus* (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) homofermentatiftir. Bu türün tüm varyeteleri 45 °C'de iyi bir şekilde gelişirken bazıları 48-52 °C'de de gelişebilmektedir. Optimum gelişme pH'sı 5.2-5.5 arasındadır. Proteolitik aktivitesi zayıftır. Ancak *S. thermophilus*'a göre daha fazla proteolitik aktiviteye sahiptir. Laktozu fermente etme yeteneği yüksektir ve laktozun yanısıra glukoz, fruktoz, galaktozu da kullanabilir (10,15). DNA'daki %G+C düzeyi 49-51 arasında değişmektedir. Genom büyüklüğünün 2.0-2.3 Mbp arasında olduğu belirlenmiştir (6). Diğer laktobasil türlerinde bir veya birkaç tane plazmite rastlanmasına karşılık, *L. bulgaricus*'un bazı kaynaklarda hiç plazmit içermediği (6) bazı kaynaklarda ise bu bakteride antibiyotiklere karşı dirençlilik sağlayan plazmit varlığına rastlandığı bildirilmektedir (16).

2. Laktik asit Bakterilerinin Klasik ve Moleküler Yöntemler Kullanılarak Tanımlanması ve Karakterizasyonu

Laktik asit bakterilerinin tanımlanması ve karakterizasyonu endüstriyel ve bilimsel açıdan gittikçe daha fazla önem kazanan bir konu haline gelmiştir (17). Laktik asit bakterilerin tanımlanabilmesi ve karakterizasyonu amacıyla bunların morfolojik, biyokimyasal ve fizyolojik özellikleri ile antibiyotik duyarlılıkları ve faj tiplerinin belirlenmesini ve serolojik olarak tiplendirilmelerini içeren klasik yöntemlerin yanısıra son yıllarda güncellik kazanan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP), Çoğaltılmış rDNA'nın restriksiyon Analizi (ARDRA), Pulsed Field Jel Elektroforezi (PFGE), Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamide Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ve DNA dizilim analizi gibi moleküler biyoloji tekniklerinden de yararlanılabilmektedir (18). Bu yöntemlerin herbiri bakteri izolatlarını cins, tür, alttür ve suş düzeyinde sınıflandırmaya, tanımlamaya ve karakterize etmeye çalışmaktadır (Şekil 1). Her yöntemin uygulama, tekrar edilebilirlik, ekipman gereksinimi ve çözüme ulaşmadaki kesinlik düzeyleri açısından avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır. Ancak genellikle, son yıllarda kullanılmaya başlanan DNA'ya dayalı moleküler yöntemler son derece güvenilir, basit ve pahalı olmayan tanımlama ve sınıflandırma yöntemleri olarak değerlendirilmektedir (18,19).



Şekil 1. Bazı DNA'ya dayalı moleküler yöntemlerin mikroorganizmaları tanımlama ve sınıflandırma düzeyleri (20)

Klasik yöntemlerle tanımlama yapabilmek için ilk aşamada, bakterilerin buldukları ortamdan izole edilip saf kültürlerinin elde edilmesi gerekmektedir. Laktik asit bakterilerinin izolasyonu amacıyla çeşitli besiyerlerinden yararlanılabilmektedir. Yüksek besleyici özelliğe sahip MRS agar ve MRS broth laktobasillerin kültürasyonu ve izolasyonu için çok sık başvurulan bir besiyeridir (21,22,23,24,25,26,27,28). Buna karşılık streptokokların kültürasyonu, izolasyonu ve sayımlarında daha çok M17 Agar besiyerinden yararlanılmaktadır (23, 27, 28). Laktik asit bakterilerinin izolatlarının saf kültür olarak elde edildikten sonra klasik yöntemlerle tanımlanması için ilk aşamada bunların; Gram reaksiyonu, mikroskopik morfolojisi ve katalaz aktivitesinin belirlenmesi yoluna gidilmektedir (22, 26, 27,29,30). Sonuçta da bu besiyerlerinde gelişen Gram pozitif, sporsuz, çubuk veya kok şekilli katalaz negatif bakteri izolatları laktik asit bakterisi olarak ayrılmakta ve bu izolatları cins düzeyinde tanımlamak amacıyla bir takım morfolojik, biyokimyasal ve fizyolojik testler uygulanmaktadır (26,27). Laktik asit bakterilerinin cins düzeyinde tanımlanması amacıyla başvurulan

biyokimyasal ve fizyolojik testlere; glukozdan gaz oluşturma, karbohidrat fermentasyon testleri, arjininden amonyak üretimi, indol, Voges-Proskauer, jelatin hidrolizi ve üreaz testleri, sukrozdan dekstran oluşturma, değişik sıcaklık ve pH değerlerinde ve farklı tuz konsantrasyonlarında gelişme testleri örnek gösterilebilir.

Çizelge 1’de yoğurt starter bakterileri olarak bilinen *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* ve *Lactobacillus delbrüeckii* subsp. *bulgaricus*’un bazı karakteristik özellikleri görölmektedir (12).

Çizelge 1. *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus bulgaricus*’un bazı karakteristik özellikleri ^{a, b}

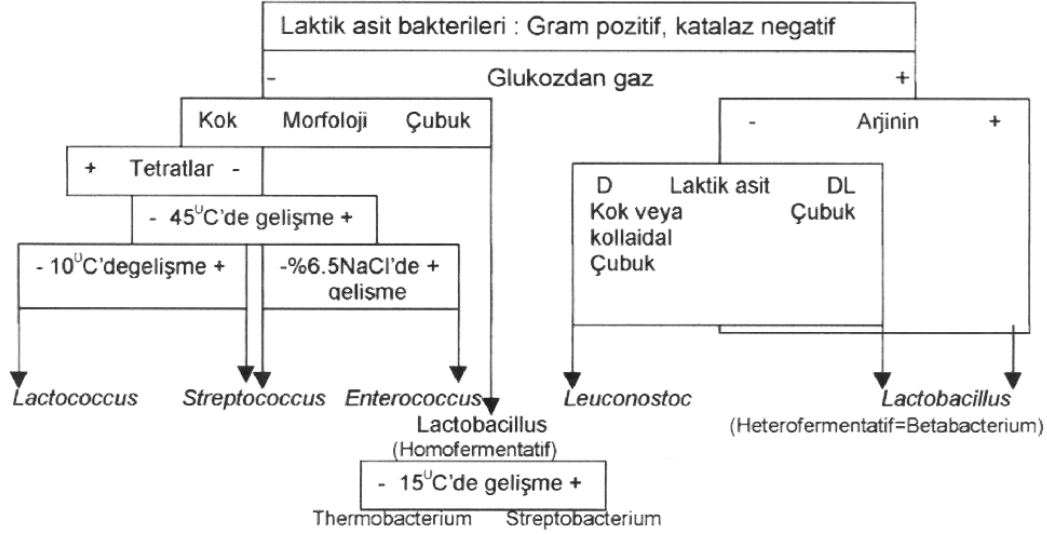
Özellik	<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>
DNA G+C (%)	37-40	32-53
Glukozdan asit oluřturma	+	+
Glukozdan gaz oluřturma		-
Glukonattan gaz oluřturma		-
Aldolaz		+
%2 NaCl içeren ortamda gelişebilme	-	+
Laktik asit konfügrasyonu	L(+)	D(-)
Sütte asit oluřturma (%)		1.7
Argininden amonyak oluřturma	-	-
15 ° C gelişme	-	-
45 ° C gelişme	+	+
Serolojik Grup	Yok	E
Vitamin gereksinimi		
Tiamin		-
Riboflavin		+
Piridoksal		-
Folik asit		-
Timidin		-
Vitamin B ₁₂		-

a) (+) = %90 veya daha fazla suşlar için pozitif reaksiyon, (-) =%90 veya daha fazla suşlar için negatif reaksiyon , (±) Değişken, yavaş veya zayıf reaksiyon.

Klasik yöntemlerden yararlanılan, et ve et ürünlerinden izole edilen laktobasillerin tanımlanması amaçlı bir çalışmada 229 izolat elde edilmiş ve bunların herbirine Gram boyama, katalaz testi, karbohidrat fermentasyon testleri, farklı pH, tuz konsantrasyonları, sıcaklıklarda gelişme testleri, sukrozdan dextran üretme testi, arginin hidroliz testi glukozdan gaz oluşturma testi, H₂S oluşturma testi, Voges Prokauer testi, D-Laktat ve L-laktat dehidrogenaz testleri ve meso diaminopimelic asit belirleme testleri uygulanmıştır (26). Elde edilen sonuçlar değerlendirilerek Şekil 2’deki tanımlama tablosu oluşturulmuştur.

Geleneksel bir fermente ürünümüz olan tarhanadan laktik asit bakterilerinin izolasyonu ve tanımlanmasını amaçlayan bir çalışmada da benzer bir yöntem izlenmiştir (27). Bu çalışma kapsamında; tarhana örneklerinden fermentasyon esnasında MRS agar ve M17 agar besiyerleri kullanılarak izole edilen 107 adet laktik asit bakterisinden 86 tanesi sözü edilen bu klasik yöntemlerle cins ve tür düzeyinde tanımlanmaya çalışılmıştır. Laktik asit bakterilerinin tanımlanmasında yararlanılan morfolojik, biyokimyasal ve fizyolojik testleri içeren klasik yöntemlere günümüzde de

başvurulmaktadır. Fermente gıdalardan laktik asit bakterilerinin izolasyonu ve bunların klasik morfolojik, biyokimyasal ve fizyolojik testlerle tanımlanması amacıyla gerçekleştirilmiş birçok çalışma vardır (19, 24; 31).



Şekil 2. Laktik asit bakterilerin ayrımı (26).

Bunun yanı sıra, mikroorganizmaların genel grup profillerine göre hazırlanmış çeşitli sayıda klasik biyokimyasal testten oluşan, hazır API (Analytical Profile Index) test kitlerinden de günümüzde tanımlama amacıyla oldukça yaygın bir şekilde yararlanılmaktadır. API 50 CH test kiti ile laktik asit bakterilerinin oldukça kolay bir biçimde tür/alt tür düzeyinde tanımlanabileceği yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (32, 33, 34). Test kitinden alınan sonuçlar, test bilgisayar programının veritabanında yer alan bakteri türleri ile sınırlı olarak tanımlanmaktadır. Tanımlama sonuçları bu programda “% tanımlama” şeklinde verilmektedir.

PCR, klasik tanımlama yöntemlerin yanı sıra bakterilerin moleküler düzeyde tanımlanması amacıyla yaygın olarak başvurulan bir teknik haline gelmiştir. Yeni ve güçlü bir teknik olan PCR'ın laktik asit bakterileri için de uygulanması kolay ve çok duyarlı bir tanımlama yöntemi olduğu bildirilmektedir (35, 36, 37, 38, 39).

PCR tekniği bir organizmaya ait genomik DNA'daki özgül bölgelerin primerler aracılığı ile çoğaltılmasını (amplifikasyonunu) sağlayan basit ama çok başarılı bir *in vitro* DNA sentezi yöntemidir. PCR ile, hücre içerisinde meydana gelen doğal DNA replikasyonu bir tüp içerisinde taklit edilerek gerçekleştirilmektedir. Hücre içerisinde DNA replikasyonunun gerçekleşebilmesi için bir kısmı enzim özelliği taşıyan birçok proteinin görev yaptığı bilinmektedir. PCR tekniğinde, replikasyonun başlayabilmesi için gerekli olan iki DNA zincirinin birbirinden ayrılması, ortam sıcaklığının 94 °C'ye kadar yükseltilmesi ve böylece iki zincir arasındaki hidrojen bağlarının kırılması ile sağlanabilmektedir. Canlı bir hücrede DNA zincirlerinin ayrılma işlemi ise, bu hücrenin optimum gelişme sıcaklığında (örneğin 37 °C'de) ve bu amaçla görev yapan yardımcı proteinleri sayesinde gerçekleştirilmektedir. Hücre içi replikasyonun

başlamasında bir başka önemli olay primaz adı verilen enzim tarafından genellikle 12 nükleotit uzunluğunda, replikasyonun başlayacağı bölgede, bir RNA primerinin yapılmasıdır. DNA polimeraz bu primere bağlanıp, 3' ucuna nükleotitleri ekleyerek DNA sentezini gerçekleştirmektedir. PCR'da ise replikasyonun başlatılacağı bölgeye özgün olarak bağlanan primerler, reaksiyon karışımının içerisine önceden eklenmekte ve DNA sentezi termofilik bir bakteri olan *Thermus aquaticus*'dan elde edilen sıcaklığa dirençli Taq DNA polimeraz enzimi tarafından gerçekleştirilmektedir. Sonuç olarak, PCR tekniğinin uygulanabilmesi için temelde; 'thermocycler' adı verilen bir cihaza ve aşağıda sıralanan karışımda yer alacak maddelere gereksinim vardır:

- Çoğaltılacak (amplifiye edilecek) olan kalıp DNA ,
- Bu DNA'da çoğaltılması planlanan bölgenin iki ucundaki DNA dizisini özgül olarak tanıyıp bağlanacak olan DNA primerleri,
- Primerlere bağlanıp bunlara 3' ucundan nükleotitleri ekleyerek sentez yapabilecek olan DNA polimeraz,
- Sentezde kullanılacak olan deoksiribonükleotid trifosfatlar (dNTP),
- Polimeraz enziminin çalışması için gerekli tampon maddeler ve tuzlar (genellikle Tris ve KCl) ,
- Enzim çalışması için önemli bir kofaktör olan Mg⁺² iyonları

Kalıp DNA; incelenecek olan hücre süspansiyonları (mikroorganizma kültürü) gibi çeşitli materyalden belli tekniklerle sağlanabilmektedir. Primer, reaksiyonun özgüllüğünü sağlayacak nitelikteki bir oligonükleotittir. Bu nedenle çok iyi tanımlanmış olması gerekir. Primer, amplifiye edilecek DNA'ya bağlanacak olan ve bağlanma bölgesini tamamlayıcı (komplementer) yapıda, kısa ve tek zincirli DNA molekülüdür (oligonükleotid). PCR için gerekli olan primerler genelde 20-33 adet baza sahiptirler. PCR tekniğinde bugün için, en yaygın kullanılan DNA polimeraz enzimi Taq polimerazlardır. Yüksek sıcaklığa dirençli olan bu enzimlerin optimum aktivite sıcaklığı yaklaşık 72 °C'dir. Taq polimerazlar, PCR tekniğinin ilk aşamasındaki yüksek sıcaklık (94-95 °C) uygulamasından etkilenmemekte ve bu nedenle de reaksiyon ortamına bir kez eklenmekte ve her döngü için ayrı bir eklemeye gerek kalmamaktadır.

PCR'ın prensibi tekrarlanan üç basamağa dayanır;

1. Çoğaltılacak olan DNA'nın yüksek sıcaklıkta (94-95 °C'de 5 dakika) denatürasyonu (ayrılması) ve bu işlem sonucunda iki tane tek sarmallı polinükleotid zincirinin elde edilmesi,
2. Seçilen primerlerin tek sarmal (polinükleotid zincirlerindeki) DNA'lardaki hedef bölgelere özgül bağlanma reaksiyonu (30-65 °C'de 30 saniye inkübasyon) : Sıcaklığın düşürülmesi ile, primerler çoğaltılacak bölgenin uçlarında yer alan kendilerine özgü dizileri tanırlar ve hidrojen bağları kurarak bağlanırlar. Burada kalıp DNA zincirlerinin birbirine bağlanmamasının nedeni, primerlerin ortamdaki derişimlerinin kalıp DNA'dan milyonlarca kez daha fazla olmasıdır. Hem derişimlerinin yüksek olması hem de kalıp DNA'ya göre çok küçük olmaları nedeniyle hareket yeteneklerinin daha fazla olması, primerlerin özgün olarak tanıdıkları kalıp DNA'ya bağlanma olasılıklarını arttırmaktadır.
3. Taq DNA polimeraz enziminden yararlanılarak primerlerin zinciri tamamlayacak şekilde uzatılmasının sağlanması (65-75°C'de 2-5 dakika inkübasyon) : Reaksiyon karışımı DNA polimerazın çalıştığı optimum sıcaklığa getirildiğinde primerlere bağlanmış olan enzim molekülleri, bunların 3' ucuna, kalıp DNA'ya

uygun nükleotidleri ekleyerek 5'-3' yönünde DNA sentezini gerçekleştirirler (Şekil 3).

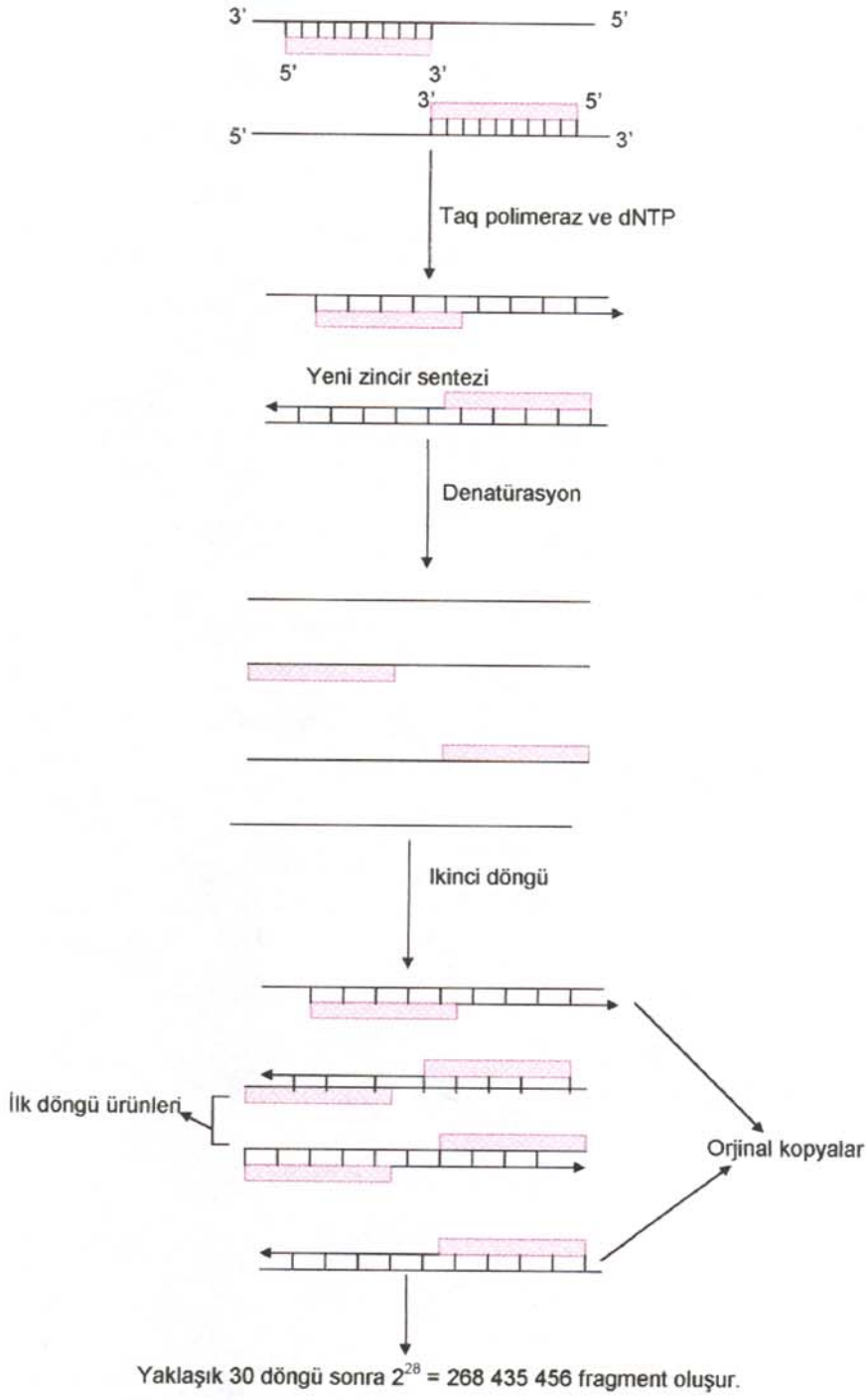
PCR tekniğinde bu temel üç basamak bir döngüyü oluşturur ve bu döngü genelde 25-35 kez tekrarlanır ve her tekrarlanışında iki primer arasında kalan özgün DNA parçasının her iki zincirinin birer kopyası çıkarılmış olur. Başlangıçta DNA molükülü sayısı, PCR işleminin kaç döngü sonunda bitirileceğini belirler. Bir PCR uygulamasında n sayıda döngü varsa, ortamda maksimum 2^n sayıda çoğaltılmış DNA beklenir (Şekil 3). Bu döngüler sonunda elde edilen PCR ürünlerinin tanımlanmasında sıklıkla kullanılan yöntem agaroz jel elektroforezidir. Elde edilen ürünler agaroz jel kullanılarak elektroforezle ayrıştırılır ve DNA zincirleri etidyum bromür ile boyanarak ultraviyole ışık kaynağında floresans vererek görünür hale getirilir. 100 baz çiftinden daha küçük DNA moleküllerinin ayırımında agaroz jel elektroforezi yetersiz kaldığı için, bunların ayırımında genellikle poliakrilamid jel elektroforezi yapılması gerekmektedir. Agaroz jel elektroforezinde, jel hazırlığındaki agaroz derişimi DNA moleküllerinin yürümesini etkileyen önemli bir faktör olarak gösterilmektedir (40) (Çizelge 2).

Çizelge 2. Agaroz jel elektroforezinde jeldeki agaroz derişimi ve bu derişimlerde etkili ayırma yapılabilecek DNA molekül büyüklükleri

Jeldeki agaroz miktarı (g/100 ml)	Etkili ayırma yapılabilecek DNA molekül büyüklüğü (bp)
0,3	5000 – 60000
0,6	1000 – 20000
0,7	800 - 10000
0,9	500 – 7000
1,2	400 – 6000
1,5	200 – 3000
2,0	100 – 2000

Hedef DNA dizisinin seçimi, doğru primerlerin seçimi, reaksiyon karışımı içerisindeki magnezyum derişiminin belirlenmesi, DNA polimeraz enziminin çok iyi çalışması, tüm uygulama boyunca ortam pH'sının korunabilmesi için Tris.HCl tamponunun belirli bir konsantrasyonda bulunması, çoğaltmayı önemli ölçüde arttıran katyonların konsantrasyon düzeyi gibi faktörler PCR uygulamasının başarısını etkileyen önemli noktalardır. PCR uygulamalarında hedef DNA dizisinin seçimi için sadece çalışılacak organizmaya ait çok spesifik bir gen bölgesinin seçilmesi gerekmektedir (36, 38, 39, 41, 42).

Laktik asit bakterilerinin tanımlanması, karakterizasyonu ve sınıflandırılması amaçlarını taşıyan ve temelde PCR'a dayalı olmakla birlikte diğer moleküler biyoloji tekniklerini de kullanan çok sayıda araştırmaya rastlanmıştır. Yapılan bir araştırmada, farklı kültür merkezlerinden sağlanmış ve bu merkezlerce süt ürünlerinden izole edildiği bildirilen toplam 31 adet *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* ve *L. delbrueckii* subsp. *lactis* suşunun toplam hücre protein profili, DNA parmakizi ve rDNA genlerinin PCR ile analizleri yapılarak karakterizasyonu yoluna gidilmiştir.



Şekil 3. Polimeraz zincir reaksiyonu

Bu çalışmadaki temel öngörü; bugüne dek yaklaşık 60 adet tür tanımı yapılan laktobasillerden yalnızca 1/3'ünün tiplendirme ve genetik sınıflandırma uygulamalarına alındığını ancak özellikle süt ve ürünleri kaynaklı laktobasillere ait tiplendirme ve sınıflandırma çalışmalarında eksiklik olduğudur. Bu amaçla öncelikle izole edilen toplam hücre proteinlerine SDS-PAGE (Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi) uygulaması yoluna gidilmiştir. Buradan alınan sonuçlar değerlendirildiğinde; *L. bulgaricus* suşlarının, ikisi dışında birbirine benzer toplam hücre protein profilleri gösterdikleri belirlenmiştir. DNA parmakizinin çıkarılması amacıyla yapılan çalışmada ise elde edilen örnekler için total DNA'lar *Hind* III, *Sma* I ve *Not* I restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilmiş ve PFGE uygulanmıştır. Sonuçta uygulanan yöntemin analiz edilen suşlar arasında benzerliklerin ve/veya farklılıkların ortaya konulmasında yeterli ve başarılı olduğu görülmüştür. Test edilen bütün suşlar için en iyi elektroforetik sonuçları veren *Not* I endonükleaz olmuştur. Bu enzimin uygulandığı örneklerin PFGE sonuçlarına göre 5 ile 150 kb arasında 20 ile 30 adet bant elde edilmiş ve örneklerin hepsi 23 farklı genomik grup altında toplanmıştır. PCR uygulamasında ise ribozomal DNA (rDNA) polimorfizminin ortaya konulabilmesi için; ARDRA-PCR (Amplified rDNA restriction analysis), 16S-23S intergenik spacer bölgesinin PCR ile çoğaltılması ve *EcoR* I ve *Hind* III enzimleri ile ribotiplendirme olmak üzere üç farklı yöntem kullanıldığı görülmektedir. Her üç yöntemde de elde edilen sonuçlar; *L. delbrüeckii* subsp. *bulgaricus*, *L. delbrüeckii* subsp. *delbrüeckii* ve *L. delbrüeckii* subsp. *lactis*'in hem tek başlarına suş tiplendirilmesinin gerçekleştirilebileceğini hem de birbirleri arasındaki DNA polimorfizminin ortaya konulabileceğini göstermektedir. Araştırmada ayrıca bu üç alt türün rDNA bölgelerinin oldukça korunmuş bölgeler olduğu da vurgulanmaktadır (43).

Streptococcus thermophilus'un genetik tiplendirmesinin ribosomal DNA (rDNA) restriksiyon analizi ile ortaya konulmasını amaçlayan bir başka çalışmada ise; 4 adedi Mozzarella peynir suyundan, 15 adedi ticari yoğurt örneğinden izole edilmiş ve 1 adedi de National Collection of Food Bacteria, Reading/UK' den alınmış toplam 20 adet bakteri suşu üzerinde çalışılmıştır. Bu çalışmada endüstriyel öneme sahip bu bakterinin tanımlanması ve karakterizasyonu için güvenilir ve çelişkisiz ölçütler içeren kromozomal DNA'ya dayalı yöntemler kullanılması gerekliliği vurgulanmaktadır. Ayrıca kromozomal DNA'nın restriksiyon endonükleaz enzimleri ile muamale edilmesi durumunda aynı türün suş tiplendirmesinin yapılabileceği ve genetik karakterizasyonunun ortaya konulabileceği de bildirilmektedir. Bakteri kromozomunda yer alan rRNA (5S, 16 S ve 23 S) operonlarının yüksek düzeyde korunmuş bölgeler olarak bildirilmesi, bunların tanımlama ve sınıflandırma çalışmalarında güvenilir bir şekilde kullanılabileceğini göstermektedir. rDNA genlerinin restriksiyon analizleri ile bir çok mikroorganizmanın tür, alt tür ve diğer taksonomik düzeyde ayrılabilmesini, ancak rDNA genlerinin PCR ile çoğaltılarak analizinin yapılmasının büyük ölçüde kolaylaştırıcı bir işlem olduğu bildirilmektedir. Sonuç olarak bu çalışmada rDNA genleri PCR ile çoğaltılmış örnekler *Hae* III enzimi ile kesilmiş ve kullanılan 16 adet *S. thermophilus* suşu aynı tip olarak, 4 adet suş ise birbirinden farklı tek tip olarak karakterize edilmişlerdir. Bu 20 adet suş arasında çok farklı genetik tiplerin ortaya konulduğu ve bunun da *S. thermophilus*'un sınıflandırılması için önemli olduğu vurgulanmıştır (44).

Collins ve ark. (45)'in gerçekleştirdiği bir çalışmada ise yine 16S rDNA genleri kullanılarak farklı kaynaklardan elde edilen toplam 55 adet *Lactobacillus* türünün 3 adet birbirine uzak genetik grup oluşturduğu ve birinci grupta *L. delbrueckii* ve alt türlerinin yer aldığı 11 adet suşun bulunduğunu, ikinci grupta ise 32 adet *Lactobacillus* ve 5 adet *Pediococcus* türünün yer aldığını (*L. casei*, *L. ruminis*, *L. salivarius*, *L. sharpeae* ve *P. damnosus* gibi), üçüncü grupta ise *L. minor*, *L. kandleri*, *L. confusus*, *L. viridescens* ve *Leuconostoc paramesenteroides* gibi bakterilerin olduğu saptanmıştır. *Lactobacillus*'un genetik olarak tiplendirilmesine çalışılan 55 adet tür için alınan sonuçlar değerlendirildiğinde; *Lactobacillus* cinsinin önemli düzeyde heterojen olduğu vurgulanmaktadır.

Lactobacillus'un genetik tiplendirilmesi amacıyla gerçekleştirilen bir başka benzer çalışmada ise, farklı kültür koleksiyon merkezlerinden sağlanan ve çeşitli hayvanların sindirim sistemlerinden izole edildiği bildirilen 34 adet *Lactobacillus* türü denemeye alınmıştır. Örneklerin hepsi 16S rDNA primerleri ile PCR'a tabi tutulmuş ve bundan sonra elde edilen ürünler restriksiyon endonükleaz enzimleri (*Bcl* I, *Bgl* II, *EcoR* I) ile kesilmiştir. Agaroz jel elektroforezinde elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, farklı genetik uzaklığı olan 4 grup ortaya çıktığı görülmüştür (46).

Moleküler biyoloji tekniklerinden laktobasillerin tanımlanması amacıyla yararlanıldığı bir diğer çalışmada ise, fermente süt ürünleri üretiminde kullanılan laktik starterlerden 8 adet *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, 5 adet *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, 23 adet *L. paracasei* subsp. *paracasei*, 16 adet *L. rhamnosus*, 3 adet *L. casei* ve 7 adet *L. helveticus* suşu denemeye alınmıştır. Çalışmada suşlar 23S rDNA problemleri kullanılarak genetik yönden tanımlanmıştır. SDS-PAGE ile protein profili analizleri de yapılan bu suşların istatistiksel analiz sonuçlarına göre kesin grupları elde edilmiştir. Araştırmada bu bakterilerin hızlı ve güvenli bir şekilde tanımlanmasında her iki teknikten de yararlanılabileceği sonucuna varılmıştır (47).

Lactobacillus acidophilus, *L. gasserii* ve *L. johnsonii* türlerinin tanımlanması ve sınıflandırılması amacıyla gerçekleştirilen bir çalışmada, 23S rDNA oligonükleotidleri kullanılarak Dot Blot hibridizasyon ürünleri elde edilmiş ve bakterilerin toplam hücre protein profilleri ortaya konmuştur. Her iki yöntemle elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında; *L. johnsonii* ile *L. gasserii*'nin çok yakın bir ilişki içinde, *L. acidophilus*'un ise belli bir genetik uzaklığa sahip olduğu ortaya konmuştur (48).

Falsen ve ark. (34) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada ise insan kaynaklı *Lactobacillus* türlerinin fenotipik ve genotipik olarak karakterize edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla; katalaz negatif, Gram-pozitif çubuk şekilli ve hücreleri zincir oluşturan 11 adet bakteri suşu seçilmiş ve bunlara sırasıyla API test kitleri kullanılarak biyokimyasal testler, toplam hücre protein analizi, hücre duvarındaki murein miktarının analizi ve DNA baz kompozisyonu analizi ile PCR ile çoğaltılmış 16S rDNA genlerinin dizim analizi uygulanmıştır. Biyokimyasal testler ile protein profili analizleri 11 adet bakterinin cins düzeyinde *Lactobacillus* olduğunu göstermiştir. Uygulanan diğer moleküler biyolojik yöntemler ile de bazı bakteriler *Lactobacillus* cinsi altında *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus gasserii* veya *Lactobacillus johnsonii* olarak tanımlanmış, bir bakterinin ise *Lactobacillus iners* sp. *nov.* olduğu ortaya konmuştur. Bu bakterilerin birbirlerine göre genetik uzaklıkları da hesaplanmış ve buna göre de *L. gasserii* ile *L. johnsonii*'nin birbirine çok yakın, *L.*

delbrueckii ile *L. iners* sp. nov.'nın ise diğerlerine ve birbirlerine uzak oldukları belirlenmiştir.

Benzeri bir çalışma Tannock ve ark. (49) tarafından gerçekleştirilmiştir. Gastrointestinal sistem, silaj ve yoğurt örneklerinden izole edilen laktobasil suşlarını tanımlama amacıyla 16S-23S rDNA intergenik spacer bölgelerine özgü primerler ile PCR uygulaması yapılmış ve araştırmada uygulanan yöntemin bütün izolatlar için kullanılabilmesi sonucuna varılmıştır. Senini ve ark. (50) tipik bir İtalyan peyniri olan Fontina'nın mikroorganizma florasını belirlemek; Drake ve ark. (51) süt ürünlerinden izole edilen çeşitli laktobasilleri tanımlamak; Chen ve ark. (52) *Lactobacillus casei*, *L. paracasei* ve *L. rhamnosus* arasındaki genetik farklılıkları ortaya koymak; Sohier ve ark. (53) ise *L. hilgardii* ve *L. brevis* arasındaki genetik uzaklığı belirlemek amacıyla rDNA oligonükleotid primerleri kullanarak PCR uygulaması yoluna gitmişlerdir.

Chagnaud ve ark. (54) tarafından yapılan bir araştırmada ise laktik asit bakterilerinin sekiz adet farklı dizilimde 16S rDNA oligonükleotid primerleri kullanılarak PCR uygulamaları sonucu basit, hızlı ve güvenilir bir şekilde tanımlanabileceği bildirilmektedir. Bu amaçla kendileri tarafından izole edilen 6 adet ve çeşitli kültür kolleksiyon merkezlerinden sağlanan 13 adet laktik asit bakterisi ele alınmış ve sekiz adet farklı dizilimde 16S rDNA oligonükleotid primerleri kullanılarak bunların tiplendirilmesine çalışılmıştır. Denenen primerlerin yalnızca biri toplam 19 bakteriden 16 adedi için başarılı bir amplifikasyon sağlamıştır. Escalente ve ark. (55) tarafından gerçekleştirilen bir diğer çalışmada ise Meksika'nın geleneksel bir fermente ürünü olan pozol hamurunda bulunan laktik asit bakterilerinin çeşitliliğini ortaya koymak amacıyla 16S rDNA analizleri uygulanmıştır. Yapılan PCR çalışması sonucunda 14 farklı laktik asit bakterisi izole edilmiş ve bunların *Lactococcus lactis*, *Streptococcus suis*, *Lactobacillus plantarum*, *L. casei*, *L. alimentarium* ve *L. delbrueckii* türleri olduğu belirlenmiştir.

Mannu ve ark. (28) tarafından yapılan bir çalışmada ise, İtalya'ya özgü Fiore Sardo isimli bir peynir çeşidinden 7 ay süren olgunlaşma süresi içerisinde laktik asit bakterilerinin sayı ve tür düzeyinde değişimleri incelenmiştir. Bu çalışmada laktik asit bakterilerinin sayımı ve izolasyonu amacıyla M17 agar ve MRS agar besiyerleri kullanılmış ve elde edilen izolatlar öncelikle biyokimyasal testler uygulanmıştır. Daha sonraki aşamada, izolatlardan elde edilen DNA'lar 10 adet farklı spesifik primer seçilerek PCR ile çoğaltılmış ve gözlenmiştir. Sonuç olarak; bu peynir örneklerinden genellikle *Lactobacillus plantarum*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. pentosus*, *L. paraplantarum*, *L. curvatus* ve *L. graminis* türlerinin izole edilip tanımlandığı, örneklerde sık olarak rastlanılan türlerin ise *L. plantarum* ve *L. paracasei* olduğu bildirilmektedir. Çalışmada seçilen örneklem içerisindeki peynir örneklerinin her biri için olgunlaşma süresinin sonuna doğru yalnızca heterofermentatif laktobasil türlerinin izole edilebildiği ve laktobasil sayılarının değişim gösterdiği saptanmıştır.

Yine İtalya'da yapılan bir çalışmada ekşi hamurdan laktik asit bakterileri ve mayalar izole edilmiş ve bunlar klasik ve moleküler biyolojik yöntemlerden yararlanılarak tanımlanmaya çalışılmıştır. Belirli bir coğrafik bölgeden alınan 25 farklı hamur örneğinden elde edilen 317 izolatın % 38'i biyokimyasal ve fizyolojik test sonuçlarına göre laktik asit bakterisi olarak ayrılmış ve bu test sonuçları 16S-23S rDNA primerleri kullanılarak PCR'la doğrulanmıştır. Maya olarak, beklenildiği gibi çok büyük oranda

ekmek mayası olarak da bilinen *Saccharomyces cerevisiae* varlığı saptanmıştır. Çalışmada fenotipik ve moleküler düzeyde tanımlanan laktik asit bakterilerinin daha ileri tiplendirmelerinin yapılacağı vurgulanmıştır (56).

Laktik asit bakterilerinin tanımlanması ve karakterizasyonu amacıyla RAPD-PCR (randomly amplified polymorphic DNA-PCR) yönteminden yararlanıma da sıklıkla rastlanmaktadır. RAPD-PCR yöntemi rastgele dizilimdeki tek ve kısa bir primer ile DNA üzerindeki çeşitli bölgeleri çoğaltarak gerçekleştirilmektedir (57,58). Tür, alttür ve suşlar arasındaki genetik farklılıkların ortaya konulabildiği bir yöntem olan RAPD-PCR'da çoğaltılan gen bölgeleri hakkında bir bilgiye sahip olunmasına gerek yoktur. Ancak bu yöntemin, bakterilerin suş düzeyine dek tanımlanmasına ve karakterizasyonuna olanak sağlayan sonuçlar verdiği değinilmektedir (20).

RAPD-PCR tekniği kullanılarak laktik asit bakterilerinin tanımlanması ve karakterizasyonu üzerine yapılan çalışmaların son yıllarda oldukça arttığı gözlenmektedir. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *L. delbrueckii* subsp. *lactis* arasındaki farklılığı moleküler düzeyde ortaya koymayı amaçlayan bir çalışmada, iki temel PCR yönteminin kullanıldığı görülmektedir (59). Bu çalışmada farklı kültür koleksiyon merkezlerinden sağlanan suşlar ile araştırmacılar tarafından çeşitli fermente ürünlerden izole edilip klasik fizyolojik yöntemlerle tanımlanan suşlar kullanılmıştır. Birinci PCR yönteminde spesifik primerler seçilerek çalışılmış ve bu iki bakterinin farklı büyüklüklerde ürünler oluşturduğu ortaya çıkarılmıştır. Daha sonra, hem alt tür düzeyinde klasik yöntemlerle ve moleküler düzeyde yapılan tanımlamayı doğrulamak hem de alttürler arası genetik farklılıkları ortaya koymak amacıyla RAPD-PCR yöntemi uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar bir dendograma yansıtılarak incelendiğinde; RAPD-PCR yönteminin çok kısa sürede ve çok sayıda kültür için bu amaçları karşılayacak sonuçlar verdiği ortaya çıkarılmıştır. Araştırmacılar bundan sonraki hedeflerinin femente süt ürünleri teknolojisinde kullanılabilecek suşların seçimi için RAPD-PCR yönteminin kullanılmasını sağlamaya dönük çalışmalar gerçekleştirmek olduğunu bildirmişlerdir.

Khaled ve ark.(33) tarafından yapılan bir başka araştırmada ise RAPD-PCR yöntemi *Lactobacillus* cinsine ait türlerin tanımlanmasını ve filogenetik analizlerini yapmak amacıyla uygulanmıştır. Gastrointestinal sistemden izole edilen ve API 50 CH ile biyokimyasal olarak tanımlanan 88 adet *Lactobacillus* suşuna PCR uygulamaları için ilk aşamada 8 adet farklı primer seçilmiştir. Bu sekiz primerin seçimine, elde edilebilirlikleri ve G+C (Guanin+Sitozin) içeriğinin yüksek olması neden olarak gösterilmiştir. Öncelikle bu primerlerin her biri tekrar edilebilirlik ve tutarlı bigiler vermeleri açısından incelenmiş ve buna göre de iki adet primer en uygun olarak seçilmiş ve çalışmalar bunlar üzerinde yoğunlaştırılmıştır. Seçilen CRA 23 ve CRA 25 primerleri birlikte_kullanılarak (multipleks) RAPD-PCR uygulanmış ve uygulanan bu tekniğin bu çalışmada kullanılan izolatlar arasındaki farklılıkları ortaya çıkarabildiği ve izolatları gruplandırabildiği vurgulanmıştır. Bu yöntemin laktobasillerin tanımlanması ve sınıflandırılması için kullanılan geleneksel yöntemleri tamamlayıcı ve alternatif bir yaklaşım yaratıcı nitelikte olduğu bildirilmektedir. Ancak bununla birlikte, izolatlarla 16S rDNA'ya dayalı bir çalışmanın da yapılması ve buradaki sonuçları destekleyici nitelikte sonuçlar elde edilip edilmediğinin karşılaştırılması gerekliliği vurgulanmaktadır. İnsandan izole edilmiş olan *L. fornicalis* sp. nov.'un laktik asit bakterilerinin sınıflandırılmasındaki yerini belirlemek için yapılan bir çalışmada ise, incelenen örneklere toplam hücre proteinleri profili analizi ve rastgele dizilimdeki

primerler kullanılarak oluşturulan RAPD-PCR ürün analizi uygulanmıştır. API 50 CH test kiti kullanılarak karbonhidrat fermentasyon testleri gerçekleştirilen kültürlerle SDS-PAGE ve RAPD-PCR uygulanmış ve elde edilen sonuçların numerik analizi ile dendogramlar oluşturulmuştur (60).

Bir çalışmada 163 adet *Streptococcus* izolatına tür tayini yapılabilmesi amacıyla OPE-04 primeri kullanılarak RAPD-PCR ve API 20 Strep test kitleri ile tanımlama yapılmıştır (61). Bu çalışmada elde edilen sonuçlar RAPD-PCR tekniğinin *Streptococcus* türlerini başarılı bir şekilde tanımladığına işaret etmektedir. Ayrıca API 20 Strep sonuçları ile RAPD-PCR tekniği sonuçları karşılaştırıldığında; kromozomal DNA'ya dayalı olarak gerçekleştirilen RAPD-PCR'in daha avantajlı olduğu belirtilmektedir.

S. thermophilus suşları arasındaki genetik farklılıkları ortaya koymaya çalışan bir başka çalışmada ise RAPD-PCR, 16S-23S rDNA intergenik spacer bölgesi kullanılarak spesifik primerlerle PCR ve total DNA *Sma* I enzimi ile kesilerek Pulsed-field jel elektroforezi (PFGE) uygulanmıştır (19). Spesifik primerlerle yapılan PCR çalışmasında elde edilen çoğaltma ürünleri *Hae* III restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilmeye çalışılmış ancak aynı primerler kullanılarak PCR işlemine tabi tutulan ve elde edilen *Enterococcus faecalis* ve *E. faecium* PCR ürünleri bu enzim ile kesilebilirken *S. thermophilus* ve *S. salivarius* suşlarına ait PCR ürünlerinde başarıya ulaşılamamıştır. Bu çalışmada; RAPD-PCR, biyokimyasal, fizyolojik ve serolojik testler uygulanarak tanımlanan süt ve süt ürünleri orijinli 83 adet *S. thermophilus* suşunun genomik DNA'larına 11 farklı rastgele primer içinden iki primer (XD8 ve XD9) seçilerek uygulanmıştır. RAPD-PCR sonuçları suşlar arası genetik uzaklık/yakınlık hesaplamalarının yapılabilmesi için numerik analize tabi tutulup kümeleme analizleri yapılarak dendogramları elde edilmiştir. Dendogramlar incelendiğinde ise 83 adet bakterinin 4 ana küme altında toplandığı ve çalışmada kullanılan tüm kültürler arası genetik uzaklık/yakınlıklarının belirlenebildiği görülmektedir. PFGE tekniği ele alındığında ise, kullanılan kültürler arasında genetik uzaklık/yakınlık hesaplama sonuçları RAPD-PCR sonuçlarına benzer bulunmuştur. Bu çalışmada, *S. thermophilus* suşlarının tanımlanması ve tiplendirilmesi amacıyla kullanılan üç farklı moleküler yöntemin de başarılı sonuçlar verdiği ve bu tekniklerin yüksek düzeyde tekrar edilebilirlik özelliklerinin olduğu, suşlar arası spesifik farklılıklarının ortaya koyma yeteneğinde ve bakteri genomundan hareketle tür/alttür düzeyinde tanımlamaya kadar gidilebildiği bildirilmektedir (19).

3. Laktik asit Bakterileri ve Plazmid Profilleri

Bütün bunların yanı sıra *S. thermophilus* ve *L. bulgaricus*'un genetik modifikasyonu üzerine yapılan çalışmalar (1) ile yine bu iki bakterinin farklı kaynaklardan izolasyonu, tanımlanması ve karakterizasyonuna ilişkin çalışmalarda plazmit profillerinin çıkarılması önemli bir yer tutmaktadır (62). Bakterilerde bulunan plazmitler, sahip oldukları genetik bilgiler ve özellikle de rekombinant DNA teknolojisinin uygulanmasında üstlendikleri görevler açısından moleküler biyoloji çalışmalarının önemli bir konusu haline gelmiştir. Laktik asit bakterileri plazmitlerinin önemi ise, daha çok bu gruptaki bakterilerin moleküler biyoloji alanında yeni araştırılmaya başlanmasından kaynaklanmaktadır. Bakterilerde plazmit varlığının saptanması ve

karakterizasyonunun yapılması, incelenen bakteride gen izolasyonları ve suş düzeyinde modifikasyonların araştırılması açısından önemlidir (16).

Plazmitler, bir çok bakteri türünde rastlanılan, ancak her suşta bulunmayan halkasal, ekstrakromozomal DNA molekülleridir. Plazmitler küçük moleküllerdir ve bu açıdan bir karşılaştırma yapılırsa; bakteriyal kromozomun %20'si ile %4'ü arasında büyüklüklerde olduğu görülür. Plazmitler, hücre yaşamı için zorunlu taşınması gereken yapılar değildir. Bununla birlikte, plazmitler pek çok bakterinin bazı özel koşullara uyum sağlamasına olanak sağlayan genetik bilgileri içermektedir. Örneğin antibiyotiklere karşı dirençlilik özelliği kazandıran R (resistant) plazmitine sahip bakteriler, aynı plazmiti taşımayan bakterilerin yaşayamadığı antibiyotik içeren ortamlarda gelişebilmekte ve bu şekilde de diğerlerinden ayrılabilirler (16).

Laktik asit bakteri türlerinin bir çoğunun birkaç tane plazmit içerdiği bilinmektedir. Bir gruptaki bakterilerin; bakteriyosin üretimi, laktoz, amino asit, sitrat metabolizması ve antibiyotiklere karşı direnç gibi önemli bazı özellikleri genellikle bu ekstrakromozomal DNA tarafından belirlenmektedir (63). Bir *Lactococcus* türünde büyüklükleri 2 ile 82 kb arasında değişen 11 adedin üzerinde plazmit formuna rastlanabilmektedir (64). Akçelik (65)'de da bir *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* suşuna ait 36 kb büyüklüğünde bir plazmit saptandığı bildirilmektedir. Buna karşılık *S. thermophilus*'da plazmitler çok yaygın değildir ve plazmit içeriği açısından daha fakir olduğu söylenebilir (1, 13). Dikkat çekici olan bu özelliğin yoğurt üretiminde *S. thermophilus* ile birlikte kullanılan *L. bulgaricus* için de geçerli olduğu kabul edilmektedir (13). Çiğ süttten izole edilen ve starter kültür olarak kullanılan birçok *S. thermophilus* suşunun plazmit içeriğine ilişkin çizelge aşağıda verilmiştir (13) (Çizelge 3).

Çizelge 3. *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* suşlarının plazmit içeriği (13)

Analiz edilen suş sayısı	Plazmit içeren suş sayısı	Endüstriyel starter	Plazmit büyüklüğü (kb)
23	15	5	2.2-3.5
35	-	13	2.2-14.7
10	3	1	2.2
50	20	9	2.9-7.6
1	-	9	2.2-3.4-25.5
30	25	4	2.2-6.9

4. Laktikasit Bakterileri ve Protein Profilleri

Klasik yöntemlerle gerçekleştirilen çalışmalar genelde zaman alıcıdır ve elde edilen sonuçların değerlendirilmesinde çoğu kez kesin bir tanıya varılamamaktadır. Bu ve benzeri nedenler, endüstriyel açıdan önemli olan laktik asit bakterilerinin hızlı ve güvenilir olarak tanımlanması ve karakterize edilmesi amacıyla alternatif bazı moleküler biyolojik yöntemlerin geliştirilmesi ve bunların uygulamaya konulması üzerinde yapılan çalışmaları artırmıştır (47). SDS-PAGE (Sodyum dodesil sulfat-polyakrilamid jel elektroforezi) laktik asit bakterilerinin tanımlanması ve karakterizasyonu amacıyla saf kültürler kullanılarak toplam hücre proteinlerine ait parmakizinin çıkarıldığı hızlı ve alternatif bir yöntem olarak bilinmektedir (18).

Standardize edilmiş koşullarda uygulanan bu moleküler biyolojik yöntem, laktik asit bakterileri için tanımlama, türler arası karşılaştırma ve karakterizasyon amaçlarıyla geniş bir kullanım alanı bulmaktadır (48). Toplam hücre proteinlerinin bu amaçla kullanımının diğer yöntemlere göre daha basit, ekonomik ve yüksek duyarlılıkta bir uygulama olduğu bildirilmektedir (66).

Protein karışımlarını analiz etmede kullanılan SDS-PAGE, poliakrilamid jel elektroforezinin değişik bir uygulama şeklidir. Bu yöntem protein moleküllerinin büyüklüklerine göre ayrılması prensibine dayalı bir yöntem olduğu için, yöntemden proteinlerin molekül ağırlıklarının belirlenmesi amacıyla da yararlanılabilmektedir. Proteinler amfoter bileşiklerdir ve net yükleri ortamın pH'sına bağlıdır. Bir çözeltide pH proteinin izoelektrik noktasından yüksek ise, proteinin net yükü negatiftir ve elektrik alanı altında anoda doğru, çözelti pH'sı proteinin izoelektrik noktasından düşük ise net yük pozitif olacak ve protein katoda doğru hareket edecektir. Proteinin net yükü molekül yapısına ve molekül büyüklüğüne bağlı olarak değişmektedir. SDS ($\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{10}\text{-CH}_2\text{OSO}_3^-\text{Na}^+$) anyonik bir deterjandır ve polipeptit omurgasının etrafını sararak proteini denatüre etmektedir. Proteinlere bağlanırken seçici olmayan SDS, polipeptide negatif yük sağlamaktadır. SDS-PAGE uygulanacak örnekler, β -merkaptoetanol ve SDS içeren tamponda 5 dakika kaynar su banyosunda ısıl işleme tabi tutulmaktadır. Böylece proteinler denatürasyona uğratarak disülfid bağlarının kırılması sağlanır. Karışımdaki her protein bu şekilde SDS molekülleriyle bağlı zincir şeklinde bir polipeptide dönüşmektedir (67). Bundan sonra proteinlerin elektrik alanı etkisi altında toplanmasını sağlayan çok geniş gözeneklere sahip olan "ön ayırıcı jel" ve bunun hemen ardından da daha küçük gözenek çapları olan ve proteinlerin ayrılmasını sağlayan "ayırıcı jel"de, protein-SDS bileşiklerinin anoda doğru hareket etmesi elektrik alanı altında sağlanmaktadır. Buna göre de, denatüre edilmiş proteinler elektrik yüklerine göre değil yalnızca molekül ağırlıklarına göre ayrılmaktadır (68).

Çeşitli yoğurt ve peynir örneklerinden izole edilen *L. bulgaricus* ve *S. thermophilus* suşlarının SDS-PAGE ile toplam hücre protein profillerinin çıkarıldığı bir çalışmada, sıvı kültürleri hazırlanan bakterilerin hücre protein izolasyonları 5 dakika süre sonikasyon işlemi uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Ön ayırıcı jel akrilamid konsantrasyonu % 4 ve ayırıcı jel akrilamid konsantrasyonu da % 10 olarak ayarlanmıştır. Kullanılan ayırma jelinin boyutları 85x60x0.75 mm olarak verilmiştir. Uygulanan SDS-PAGE işlemi sonunda elde edilen jellerde 25 ile 30 adet arasında bant varlığına rastlanmıştır. Değerlendirmeler her bakteriye ait bantlar için tipik bant varlığı ya da yokluğu şeklinde tek tek karşılaştırılarak yapılmıştır. Bütün *L. bulgaricus* suşlarının benzer bir şekilde 69, 65, 56, 50, 48 ve 43 kDa'da görünen tipik bantlar vermesine karşın kontrol olarak kullanılan ve kültür koleksiyon merkezinden sağlanmış iki adet suşun 48 kDa büyüklüğünde bir bant vermediği kaydedilmiştir. *S. thermophilus* suşları ise 100, 49, 47, ve 41 kDa büyüklüğünde dört tipik bant vermiş ve kontrol suşları ile aralarında bir farklılık gözlenmemiştir. Farklı iki cinse ait olan bu bakteriler arasında 32 ve 26 kDa ile 63 ve 59 kDa arasında kalan bantlarla 100 kDa büyüklüğündeki protein bantları açısından farklılıklar olduğu bildirilmektedir. SDS-PAGE tekniğinin laktik asit bakterilerinin tanımlanması ve karakterizasyonu için yararlı bir teknik olduğunu bildiren araştırmacılar, standardize edilmiş deney koşullarında küçük bant farklılıklarının da göz önüne alınabileceği ve daha fazla sayıda farklı cinse ait türlerin de incelemeye dahil edildiği yeni bir çalışmaya gerek olduğu sonucuna varmışlardır (66). Bir diğer çalışmada, Beyaz peynir örneklerinden

izole edilen 77 adet laktik asit bakterisini fenotipik yöntemlerin yanısıra SDS-PAGE yöntemi ile tanımlanmıştır. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde birbirinden farklı ve ilginç biyoteknolojik profiller veren laktik asit bakteri izolatlarının peynir yapımında starter kültür olarak kullanılabilceği vurgulanmaktadır (69).

Heterofermantatif *Lactobacillus* türlerinin incelendiği ve türler arası farklılıkları ile moleküler ilişkinin ortaya konulmasını amaçlayan bir başka çalışmada da SDS-PAGE tekniğinin kullanıldığı görülmektedir (70). Protein profilleri sonuçları protein bantlarının varlığı/yokluğundan hareketle numerik analiz yapılarak değerlendirilmiştir. Elde edilen verilere; genel amacı gruplanmamış verileri benzerliklerine göre sınıflandırmak (kümelemek) ve bireyler arası farklılıkları ve ait oldukları kitleleri belirlemek olan kümeleme analizi uygulanarak dendogramları çıkarılmıştır. Dendogramlar incelendiğinde *L. buchneri*, *L. brevis* ve *L. fermentum* suşlarından oluşan 3 ayrı küme tespit edilmiştir. Bu çalışmada incelenen suşların birbirleri arasında ve kendi içlerinde benzerlikleri ortaya konulabilmiştir. Sonuç olarak da; toplam hücre protein profillerinden yola çıkılarak suşlar arası akrabalık ilişkisinin ortaya konulabileceği, ancak sonuçların DNA'ya dayalı moleküler yöntemlerle desteklenmesi gerekliliği vurgulanmıştır.

5. Sonuç

Yoğurt bakterileri olan *S. thermophilus* ve *L. bulgaricus*'a çiğ süt ve pastörize sütte sık olarak rastlanmaktadır. Bu iki yoğurt bakterisi termodurik özellik göstermekte ve bu nedenle de pastörize süttten izole edilebilen bakteriler arasında önemli bir yer tutmaktadır (8, 71). Fermente süt ürünlerinden biri olan yoğurt, genellikle homojenize edilmiş pastörize süte eklenen *S. thermophilus* ve *L. bulgaricus*'un birlikte gerçekleştirdikleri laktik asit fermentasyonu ile elde edilen ve bu yoğurt starterlerini canlı olarak içeren bir üründür (72). Yoğurt Balkan ve Orta Doğu ülkelerinde çok tüketilen bir ürün olmakla birlikte günümüzde dünyanın pekçok ülkesine yayılmış ve tüketimi de artmıştır (73, 74). Yoğurt Türkçe kökenli bir kelime olup, değişik ülkelerde farklı isimlerle anılabilmektedir (72). Yoğurt üretimi sırasında, ısıl işlem uygulanan sütte, denatüre olan serum proteinleri ile κ -kazein ve β -laktoglobulin interaksiyonları oluşmaktadır. Bu nedenle yoğurt oluşumunda görülen pıhtı-jel, gerçekte kazein ve denatüre serum proteinlerinin birlikte koagülasyonu sonucu ortaya çıkmaktadır. Denatüre serum proteinleri ile birlikte asidik ortamda bir araya gelerek kümeleşen kazein parçacıkları yoğutta küme ve filament şeklinde oluşumlar meydana getirmektedir. Böylece proteinlerin üç boyutlu ağ oluşumu, yağ tanecikleri ve suda çözünen maddelerle birlikte süt serumunu sararak yoğurdun kendine özgü jel yapısını oluşturmaktadır (75).

Yoğurtta aranan en önemli özellikler yapı, tat, koku, asitlik ve görünüş olarak sıralanabilmektedir. Bu özellikleri etkileyen faktörler ;

- kullanılan hammaddenin kalitesi,
- toplam kurumadde,
- hammaddeki protein içeriği
- kazein ve kazein olmayan proteinler arasındaki oran,
- asitlik,
- katkı maddeleri,
- ısıl işlem normuna bağlı olarak denatüre olan serum proteinleri oranı,

- denatüre serum proteinleri ile kazein arasındaki interaksiyon,
 - homojenizasyon,
 - kullanılan starter kültürlerin özellikleri ve inokülasyon oranları,
 - inkübasyon normları, soğutma ve depolama şartları
- olarak sıralanabilir (76,77).

Ancak bilindiği gibi, fermente süt ürünlerinin standart ve yüksek kalitede üretilmesi, büyük ölçüde güvenilir starter kültürlerinin kullanımına bağlıdır. Starterler ürüne istenen yapı, tat, koku ve aroma gibi özellikleri kazandırmak, belli ve standart kalitede ürün elde etmek amacıyla kullanılan, bilinen özelliklere sahip mikroorganizma kültürleridir. Laktik starterlerin temel fonksiyonları; laktozun fermentasyonu ile laktik asit üretimi, asetaldehit ve diasetil gibi aroma sağlayan uçucu bileşiklerin üretimi, proteolitik ve lipolitik aktivite, ürünü patojen ve bozulma etmeni mikroorganizmalardan koruyan asidik ortamın oluşturulması olarak sıralanabilir (72).

S. thermophilus ve *L. bulgaricus*'tan süt endüstrisinde laktik starter olarak ayrı ayrı yararlanılabilmektedir. Ancak bu bakterilerin süt endüstrisi açısından önemi, daha çok ikisinin bir arada yoğurt starteri olarak kullanılmasından kaynaklanmaktadır. *S. thermophilus* ve *L. bulgaricus* bir arada yoğurt üretiminden sorumlu olan laktik starterlerdir. Bu iki starterin temel fonksiyonunu sütte sinerjistik etki ile laktik asit üretimi ve yoğurt yapı ve aromasını oluşturmaktır (72).

Yoğutta starter bakterilerin fonksiyonlarına bağlı olarak ortaya çıkan kalite kriterlerinin başlıcaları ise; asitlik, aroma bileşikleri, proteolitik aktivite, viskozite, toplam canlı hücre sayısı ve organoleptik karakteristik olarak sıralanabilir (78, 79).

Yoğurt üretimi esnasında oluşan laktik asit kazein misellerinin kararlılığına yardımcı olduğu gibi, süt proteinlerinin kaagülasyonu ve yoğurt jelinin oluşumunu da sağlamaktadır. Laktik asit, yoğurda tipik hoşça giden asit tadı da vermektedir. Asitlik gelişimi, soğuk depolama koşullarında belli düzeyde sürmektedir. Asitlik, proteinlerin su tutma kapasitelerini etkilediğinden pıhtının reolojik özellikleri olarak belirtilen konsistens, viskozite, serum ayrılması (sineresis) üzerinde de oldukça etkilidir. Yoğurda işlenen sütün pıhtılaşması pH 5.3'de başlamakta, pH 5.0'de belirginleşmekte ve pH 4.7'de ise tamamlanmaktadır. Depolamadaki asitlik gelişimi üzerine etkili faktörlerden birisi de kullanılan kültürün aktivitesidir (12).

Asetaldehit, yoğurt starterlerinin üründe oluşturduğu ve yoğurt için karakteristik olan en önemli aroma bileşenidir. Bunun yanısıra aseton, aseton veya diasetil gibi karbonil bileşikleriyle dimetil sülfür, butanon ve düşük karbonlu yağ asitleri de yoğurt aromasını oluşturan diğer bileşiklerdir. *S. thermophilus* ve *L. bulgaricus* sinerjistik aktivite sonucunda, yoğurtta bireysel aktivitelerine göre daha fazla miktarda asetaldehit oluşturmaktadır. Asetaldehit oluşumunda yoğurt starterindeki suş farklılığının etkili olduğu da belirlenmiştir (12).

S. thermophilus ve *L. bulgaricus* genellikle zayıf bir proteolitik aktiviteye sahiptirler. Ancak bu düşük proteolitik aktivite bile ürünün fiziksel yapısında önemli değişikliklere yol açabilmekte ve aroma bileşiklerinin oluşumuna da yardımcı olmaktadır (12).

Bütün bu açıklamalar, yoğurt starterlerinin yoğurt üretimi ve kalitesindeki önemini açıkça ortaya koymaktadır. Geleneksel bir fermente ürünümüz olan yoğurt, günümüzde ülkemizdeki ileri teknoloji uygulayan sınırlı sayıdaki firma tarafından yurtdışı kaynaklı ticari yoğurt starter kültürleri kullanılarak üretilmektedir (80). Söz konusu bu firmalar, yoğurt kültürlerini uluslararası ticari öneme sahip olan starter kültür üreticisi Chr. Hansen's (Chr. Hansen's Laboratorium, Danmark A/S, Danimarka), Labor Wiesby (Laboratorium Wiesby GmbH & Co., Almanya) ve NIZO (Hollanda) gibi kuruluşlardan sağlamaktadır. Bu starter kültür üreticisi kuruluşlar, yoğurt bakterilerini tek tek veya bir arada yoğurt starteri olarak hazırlayıp, genellikle liyofilize formda pazarlamaktadır.

Ülkemizde ileri teknoloji uygulayan firmalar, yoğurt üretiminde çoğunlukla yoğurt bakterilerini kombine olacak şekilde içeren liyofilize formdaki hazır ticari yoğurt starter kültürlerinden yararlanmaktadır. Liyofilize formdaki ticari yoğurt starter kültürleri genelde üç tipte hazırlanıp pazarlanmaktadır. Birinci tipteki kültürler (Chr. Hansen's Dri-Vac), ilk aşamada yoğurt üreticisi tarafından aktiveleştirilmekte ve daha sonra bu aktif kültürden "ara", "ana" ve "bulk" kültürler hazırlanmakta ve elde edilen bulk kültürden yoğurt üretiminde yararlanılmaktadır. İkinci tipteki liyofilize kültürler (Chr. Hansen's Redi-Set), direkt bulk kültürleri hazırlanarak kullanılmaktadır. Üçüncü tipteki liyofilize kültürler (Chr. Hansen's DVS-Direct Vat Set) ise aktiveleştirilip ara, ana ve bulk kültürleri elde edilmeden, yoğurda işlenecek süte direkt olarak aşılanmaktadır. Bunun yanına yoğurt üreticisi firmalar, yoğurt bakterilerini tek tek liyofilize formdaki *S. thermophilus* ve *L. bulgaricus* kültürleri şeklinde de satın alabilmektedir. Bu kültürler ayrı ayrı aktiveleştirdikten sonra belli oranlarda bir araya getirilerek yoğurt starter kültürü elde edilmekte ve bundan da ara, ana ve bulk kültürler hazırlanıp, bulk kültür üzerinden üretime geçilmektedir.

Chr. Hansen's ve Labor Wiesby gibi kuruluşların pazarladıkları bireysel *S. thermophilus* ve *L. bulgaricus* kültürleri ile bunları kombine şekilde içeren yoğurt kültürleri suş farklılığından kaynaklanan bazı temel niteliklere sahiptir. Firmalar üretilen yoğurtta istenilen özelliklere bağımlı olarak birbirinden oldukça farklı kültürleri önermektedirler (80). Örneğin, Chr. Hansen firmasının CH-1 koduyla pazarladığı liyofilize formdaki *S. thermophilus* kültürünün temel özelliği normal asitlik sağlama, CH-3 (filant) kültürünün temel özelliği ise ürüne viskoz karakter kazandırmadır. Labor Wiesby'nin Yoghurt 2 yoğurt kültüründen normal, Yoghurt 2'den ise viskoz yoğurt üretimlerinde yararlanılmaktadır. Bireysel bakteri kültürleri ve yoğurt kültürlerindeki bakterilerin fajlara duyarlılıkları ve asetaldehit üretme kapasiteler de farklı farklıdır.

Ülkemizdeki ileri teknoloji uygulayan yoğurt üreticisi bazı firmalar yoğurt starter kültürünü, farklı starter üreticisi kuruluşlara ait iki veya daha fazla sayıdaki *S. thermophilus* ve *L. bulgaricus* kültürünü belli oranlarda karıştırarak da elde edebilmektedir. Diğer taraftan, yoğurt üreticileri, üretimde sürekli olarak aynı yoğurt starter kültürünü kullanmamakta ve zaman zaman aynı kuruluşun farklı tipteki bir starterini ya da farklı kuruluşa ait bir starteri rotasyona sokmaktadır. Rotasyondaki temel amaç ise, işletmedeki olası bakteriyofaj sorununun üstesinden gelmektir.

Ülkemizde genellikle yerel üretimin söz konusu olduğu küçük ölçekli ve ilkel üretim yapan bir çok yoğurt üreticisi firma ise çoğunlukla, ileri teknoloji uygulayan firmaların ürettiği yoğurtları kendi üretimlerinde yoğurt kültürü olarak kullanmaktadır. Bu durum

evlerde yapılan yoğurt üretimleri için de geçerlidir. Küçük yerel işletmeler bunun da ötesinde, çoğu zaman bir önceki üretimlerdeki yoğurttan da yoğurt kültürü olarak yararlanabilmektedirler. Ancak bu işletmelerde, her zaman için kaliteli yoğurt üretimi söz konusu olamamakta ve kalite sürekliliği bulunmamaktadır. Kalitenin yakalanamamasının en önemli nedeni, ileri teknoloji uygulayan yoğurt üreticilerinin kullandığı ticari starter kültürlerin sahip olduğu özelliklerdir. Ticari starter kültürlerin çok sayıda pasaj yapmaya uygun olmadığı ve birkaç pasajdan sonra kaliteyi belirleyen niteliklerini kaybettiği bilinen bir gerçektir. Bu durumun büyük ölçüde, ticari yoğurt starteri pazarlayan kuruluşların bu özellikleri taşıyan bakteri suşlarını seçip kullanmasından veya seçilen bakteri suşlarına bu yönde kazandırılan genetik özelliklerden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Bu açıklamalar genel olarak değerlendirildiğinde; ülkemizdeki yoğurt üretimlerinde, dolaysız veya dolaylı olarak uluslararası ticari starter üreticisi kuruluşlara ait yoğurt starter bakteri suşlarının kullanıldığı ortaya çıkmaktadır. Türkiye’de ilk modern süt fabrikası 1957 yılında Atatürk Orman Çiftliği’nde kurulmuş ve faaliyete geçmiştir. 1963 yılında ise örnek tesisler kurmak ve işletmek yoluyla Türkiye’de süt endüstrisinin gelişmesine katkıda bulunmak amacıyla Türkiye Süt Endüstrisi Kurumu kurulmuş ve bu kuruluşun ilk fabrikaları İstanbul, İzmir ve Adana’da 1968 yılında faaliyete geçmiştir. Türkiye’de gerçek anlamda saf kültür kullanımına bu modern tesislerde 1970’li yıllarda başlandığı bildirilmektedir. Buna karşın, Chr-Hansen’s Danimarka’da 1890 yılında, Amerika Birleşik Devletleri’nde ise Marchall laboratuvarları 1906 yılında peynir ve tereyağı için tek ticari saf kültürü üretilip pazarlamaya başlamıştır (81).

Bu tarihsel gelişime paralel olarak ülkemiz araştırmacıları tarafından yoğurtlardan izole edilen laktik asit bakterilerinin starter olarak seçilme ve kullanılma olanakları üzerine çalışmalar yapıldığı da görülmektedir. Ankara piyasasından toplanan farklı yoğurt örneklerinden izole edilen yoğurt bakterilerinin tanımlanmaları fenotipik yöntemlerle yapılmış ve elde edilen suşların aktifliklerinin saptanması amacıyla proteolitik aktivite ve laktik asit üretimi gibi özellikleri incelenmiştir. Bundan sonra starter suş kombinasyonları oluşturularak yoğurt üretimine uygunlukları organoleptik, mikrobiyolojik ve aroma maddelerinin oluşması açısından incelenerek ortaya konmaya çalışılmıştır (82). Bir başka çalışmada ise İzmir ve çevresinden toplanan yoğurt örneklerinden izole edilen ve fenotipik yöntemlerle tanımlanan yoğurt bakterilerinin özelliklerinin belirlenmesi ve saf kültür halinde üretilmesi konusunda araştırmalar gerçekleştirildiği görülmektedir (83).

Bu belirlemeler doğrultusunda, ülkemizde yerel ve orjinal yoğurt starter bakterilerinin izolasyonu ve karakterizasyonu ve bunlardan yoğurt üretimine uygun olanların seçimi konusundaki araştırmaların, izolasyon için uygun ve orjinal kaynakların seçilmesi ve genetik çalışmalara da ağırlık verilerek gerçekleştirilmesi gerekliliği ortaya çıkmaktadır.

Ülkemiz açısından önemli olan diğer bir konu ise, süt ve ürünleri sanayiinin gelişimine bağlı olarak yoğurt üretimi için starter kültür temini açısından yurtdışı kaynaklara bağımlı olmamız ve bunun için çok büyük ekonomik harcamalar yapma zorunluluğunda kalmamızdır.

Kaynaklar

1. Axelsson, L.T., 1993, Lactic acid bacteria : classification and physiology, Lactic Acid Bacteria. Salminen, S., vonWright, A. (eds), Marcel Dekker, Inc., Newyork, 433s
2. Schleifer, K.H., Ehrmann, M., Beimfohr, C., Brockmann, E., Ludwig, W., Amann, R., 1995, Application of molecular methods for the classification and identification of lactic acid bacteria, Int.Dairy Journal. 5,1081-1094
3. Low, B.A.,Hansen,E.B.,1997,Microbiology and Biochemistry of cheese and fermented milk , Low, B.A. (eds), Blackie Academic and Professional, London, 337s.
4. Scheleifer, K.H., Ludwig, W., 1994, Phylogenetic relationships of lactic acid bacteria. The Lactic Acid Bacteria, Vol 2, The Genera of Lactic Acid Bacteria, Wood, B.J.B., Holzapfel, W.P. (eds), Chapman and Hall, London.
5. Ludwig, W., Neumaier, J., Klugbauer, N., Brockmann, E., Roller, C., Jilg, S., Reetz, K., Schachtner, I., Ludwigsen, A., Wallner, G., Bachleitner, M., Fischer, U., Scheleifer, K.H., 1993, Phylogenetic relationships of bacteria, Antonie van Leeuwenhoek. 64, 285-304
6. Davidson, B.E., Kordias, N., Dobos, M., Hillier, A.J., 1996, Genomic organization of lactic acid bacteria, Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology. 70, 161-183.
7. Vuyst, E.D.,Vandamme, B., 1994, Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria, Blackie Academic,London,1-91p.
8. Krieg , N.R., Holt, J.G., 1984, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams and Wilkins, Baltimore, pp 1043-1234.
9. Farrow, J.A.E., Collins,M.D., 1984, DNA base composition, DNA-DNA homology and long-chain fatty acid studies on *Streptococcus thermophilus* and *Streptococcus salivarius*, J.Gen.Microbiology. 130, 357-362
10. Wood, B.J.B., Holzapfel, W.H., 1995, *The Genera of Lactic Acid Bacteria*, Vol.2, Blackie Academic and Professional, London, 398 p.
11. Marshall, V.M.E., 1987, Fermented milks and their future trends: microbiol aspects. *Journal of Dairy Research*, 54, p 559-574.
12. Tamime, A. Y., Deeth, B.C., 1980, Yoghurt: Techcnology and Biochemistry, Journal of Food Protection, Vol. 43, No : 12, p 939-977.
13. Mercenier, A., 1990, Molecular genetics of *Streptococcus thermophilus*, FEMS Microbiol. Reviews, 87, 61-78.
15. Parker, M.T.,1983, Streprococcus and Lactobacillus : Principles of Bacteriology, virology and immunity. Topey and Wilson, G.S. (Eds), London, 173-211.
16. Wang ,T.T., Lee, B.H., 1997, Plasmids in *Lactobacillus*, Critical Rewiews in Biotechnology, 17(3) 227-272.
17. Rademaker, J.L.W., De Bruijn, F.J., 2000, Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer-assisted pattern analysis,
18. Busch, U., Nitschko, H., 1999, Methods for the differentiation of microorganisms, Journal of Chromatography B. 722,263-278
19. Moschetti, G., Blaiotta, G., Aponte, M., Catzeddu, P.,Villani, F., Deiana, P., Coppola,S., 1998, Random amplified polymorphic DNA and amplified ribosomal DNA spacer polymorpism : powerful methods to differantiate *Streptococcus thermophilus* strains, Journal of Applied Microbiology. 85,25-36

20. <http://w.w.w.msu.edu.edu/user/debruijn/dna1-4.htm>.
21. Rogosa, M., Wiseman, R.F., Mitchell, J.A., Disraely, M.N., Beaman, A.J., 1953, Species differentiation of oral lactobacilli from man including description of *Lactobacillus salivarius* nov. spec. and *Lactobacillus cellobiosus* nov. spec., *Journal of Bacteriology*, 65, p 681-698.
22. Sharpe, M.E., 1979, Identification of lactic acid bacteria. Identification Methods for Microbiologists. eds. Skinner, F.K. and Lovelock, D.V., Academic Press, London, p 233-259.
23. Collins, C.H., Taylor, C.E.D., 1967, *Microbiological Methods*, 2nd edition, Butterworth Co. Ltd., London, 404 p.
24. Hitchener, B.J., Egan, A.F., Rogers, P.J., 1982, Characteristics of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged beef, *Journal of Applied Bacteriology*. 52,31-37
25. Sürmeli, G., Tunail, N., Köşker, Ö., 1982, Laktik asit bakterilerinin izolasyonunda kullanılan besiyerlerinin karşılaştırılması üzerinde araştırmalar, *Gıda*, 1, 3-9.
26. Schillinger, U., Lücke, F.K., 1987, Identification of lactobacilli from meat and meat products, *Food Microbiology*, 4, 199-200.
27. Temiz, A., Yılmaz, A.N., 1998, Identification of lactic acid bacteria isolated from tarhana during fermentation, *Acta Alimentaria*. 27 (3), 277-291.
28. Mannu, L., Comunian, R., Scintu, M.F., 2000, Mesophilic *Lactobacilli* in Fiore Sardo cheese : PCR-identification and evolution during cheese ripening, *International Dairy Journal*. 10, 383-389
29. Sharpe, M.E., Fryer, T.F., Smith, D.G., 1966, Identification of lactic acid bacteria. Identification Methods for the Microbiologists eds. Gibbs, B.M. and Skinner, F.K., Academic Press, London, 145 p.
30. Tunail, N. 1982, Yoğurtlardan izole edilen bazı termobakterilerin identifikasyonları ve izolatların DNA homolojileri, *Mikrobiyoloji Bülteni*. 16,113-123
31. Oyewole, O., Odunfa, S.A., 1990, Characterization and distribution of lactic acid bacteria in cassava fermentation during fufu production, *Journal of Applied Bacteriology*.68,145-152
32. Lick, S., Keller, M., Heller, K.J. , 1996, Identification of starter cultures in thermally treated yogurt, *Journal of Dairy Research*, Vol. 163, Iss 4, pp 607-613.
33. Khaled, D.K., Neilan, B.A., Henriksson, A., Conway, P.L., 1997, Identification and phylogenetic analysis of *Lactobacillus* using multiplex RAPD-PCR, *FEMS Microbiology Letters*. 153,191-197
34. Falsen, E., Pascual, C., Sjöden, B., Ohlen, M., Collins, M.D., 1999, Phenotyping and phylogenetic characterization of a novel *Lactobacillus* species from human sources : description of *Lactobacillus iners* sp. nov., *Int. Journal of Systematic Bacteriology*. 49, 217-221.
35. Klijn, N., A.H., Weerkamp, De Vos, W.M., 1991, Identification of mesophilic lactic acid bacteria by using polymerase chain reaction amplified variable regions of 16S rRNA and specific DNA probes. *Appl. Environm. Microbiol.*, 57, p 3390-3393.
36. Stefan, R. I., Atlas, R.M., 1991, Polymerase Chain Reaction, Application in Environmental Microbiology.45,137-161
37. Gasson, M.J., De Vos, W.M., 1994, Genetics and Biotechnology of Lactic Acid Bacteria, Blackie Academic and Professional, London, 398p
38. Swamithan, B., Feng, P. , 1994, *Appl. Environ. Microbiol.*, 48, pp 401-426
39. Watson, J.D., Gilman, M., Witkovski, J. Zoller, M., 1992, Recombinant DNA, Scientific American Books, USA.

40. İşcan, M., Açıık, L., Özkara, A., Kocagöz, T., Akbıyık, F., Hızel, N., 2000, Klinik Laboratuvarlarda moleküler yöntemler, Türk Biyokimya Derneği, Ankara
41. Griffin, H.G., Griffin, A.M., 1994, *PCR : Technology Current Innovations*, CRC Press, USA.
42. Maniatis, R.; Fritsh, E.F.; Sambrook, J., 1982, In *Molecular Cloning : A laboratory Manual*, Cold Spring Harbos, New York.
43. Moschetti, G., Blaiotta, G., Aponte, M., Mauirello, G., Villani, F., Coppola, S., 1997, Genotyping of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* an determination of the number and forms of *rrn* operons in *L. delbrueckii* and its subspecies, *Research Microbiology*. 148, 501-510
44. Salzano, G., Moschetti, G., Villani, F., Pepe, O., Mauirello, G., Coppola, S. 1994, Genotyping of *Streptococcus thermophilus* evidenced by restriction analysis of ribosomal DNA , *Research Microbiology*. 145, 651-658
45. Collins, M.D., Rodriuges, U., Ash, C., Aquirre, M., Farrow, J.A.E., Martinez, M.A., Phillips, B.A., Williams, A.M., Wallbanks, S., 1991, Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse tranacriptase sequencing of 16S Rna, *FEMS Microbiology Letters*. 77, 5-12
46. Rudtong, S., Tannock, G.W., 1993, Differentiation of *Lactobacillus* strains by ribotyping, *Applied and Environmental Microbiology*. 59(10), 3480-3484
47. Hertel, C., Ludwig, W., Pot, B., Kersters, K., Schleifer, K.H., 1993, Differentiation of *Lactobacilli* occurring in fermented milk products by using oligonucleotide probes and electrophoretic protein profiles, *System. Appl. M*. 16
48. Pot, B., Hertel, C., Ludwig, W., Descheemaeker, P., Kersters, K., Schleifer, K.H., 1993, Identification and classification of *Lactobacillus acidophilus* *L.gasseri* and *L. johnsonii* strains by SDS-PAGE and rRNA-targeted oligonucleotide probe hybridization, *Journal of General Microbiology*. 139, 513-517
49. Tannock, G.W., Tilsala, T.A., Radtong, S., Ng, J., Munro, K., Alatossava, T., 1999, Identification of *Lactobacillus* isolates from the gastrointestinal tract, silage and yoghurt by 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region sequence comparisons, *Applied and Environmental microbiology*. 65, 4264-4267
50. Senini, L., Coppa, F., Cocconcelli, P.S., 1997, Use of rRNA – targeted oligonucleotide probes for the characterization of the microflora from fermentation of Fontina cheese, *Food Microbiology*. 14, 469-476
51. Drake, M., Small, C.L., Spence, K.D., Swanson, B.G., 1996, Rapid detection and identification of *Lactobacillus* spp. in dairy products by using the polymerase chain reaction, *Journal of Food Protection*. 59 (10) 1031-1036.
52. Chen, D., Coulan, J., Funel, A.L., Chan, Y.N., 2000, Comprative analysis of the genes encoding 23S-5S Rna intergenic spacer regions of *Lactobacillus casei*-related strains, *Int. Journal of Systematic and Evoluti onary Microbiology* .50, 471-478
53. Sohier, D., Coulan, J., Funel, A.L., 1999, Molecular identification of *Lactobacillus hilgardii* and genetic relatedness with *Lactobacillus brevis*, *Int. Journal of Systematic Bacteriology*. 49, 1075-1081.
54. Chagnaud, P., Machinis, K., Coutte, L.A., Marecat, A., 2001, Rapid PCR based procedure to identify lactic acid bacteria: application to six common *Lactobacillus* species, *Journal of Microbiological Methods*. 44, 139-148
55. Escalante, A., Wachter, C., Forres, A., 2001, Lactic acid bacteria diverst in the traditional Mexican fermented dough pozol as determined by 16S rDNA sequence analysis, *Int. Journal of Food Microbiology*. 64, 21-31

56. Corsetti, A., Lovermicocca, P., Morea, M., Baruzzi, F., Tosti, N., Gobbetti, M., 2001, Phenotypic and molecular identification and clustering of lactic acid bacteria and yeasts from wheat (species *Triticum durum* and *Triticum aestivum*) sourdoughs of southern Italy, *Int. Journal of Food Microbiology*. 64,95-104
57. Sineo, L., Martini, R., Borghi, G., Failli, M., 1993, Analysis of genetic markers by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR), *Boll. Chim. Farmaceutico*. 132, 201-202
58. Brown, T.A., 1995, Gene cloning an introduction, Chapman & Hall, London,334s
59. Torriani, S., Zapparol, G., Dellaglio, F., 1999, Use of PCR-Based methods for rapid differentiation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, *Applied and Environmental Microbiology* . 65(10),4351-4356
60. Dicks, L.M.T., Silvester, M., Lawson, P.A., Collins, M.D., 2000, *Lactobacillus fornicalis* sp. *nov.*, isolated from the posterior fornix of the human vagina , *Int. Journal of Systematic and Evol. Microbiology*. 50, 1253-1258.
61. Gillespie, B.E., Jayarao, B.M., Oliver, S.P., 1997, Identification of *Streptococcus* species by randomly amplified polymorphic deoxyribonucleic acid fingerprinting, *Journal Dairy Science*. 80, 471-476
62. Zourari, A., Desmazeaud, M.J., 1990, Studies of *S. thermophilus* and *L. bulgaricus* strains isolated from Greek yoghurts. *Processing and Quality of Foods*. Zeuthen, P., Cheftel, J.C., Eriksson, C., Gormley, T.R., Linko, P., Paulus, K.(eds), 1. Food processing, Commission of the European Communities, Elsevier, New York, 2.46-2.51.
63. Ruiz-Barba, J.L., Piard, J.C. and Jimenez-Diaz, R., 1991, Plasmids profiles *L. plantarum*, *J. Appl. Bacteriol.* 71, 417-421.
64. Leenhouts, K.J., Kok, J., Venema, G., 1990, Stability of Integrated plasmids in the chromosome of *L. lactis*, *Appl. and Environ. Microbiology*. 56(9), 2726-2735
65. Akçelik, M., 1999, The conjugal plasmid pLL 10236 encodes lactose fermentation ability, restriction/modification activity, bacteriocin production and immunity in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, LL102, *Food Microbiology*. 16(5), 487-494
66. Tsakalidou, E., Zoidou, E., Kalantzopoulos, G., 1992, SDS-polyacrilamide gel electrophoresis of cell proteins from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* strains isolated from yoghurt and cheese , *Milchwissenschaft*. 47 (5), 296-298.
67. Dunn, M.J., 1993, Gel electrophoresis : Proteins. Bias Scientific . Oxford, U.K.
68. Hames, B.D., Rickwood, D., 1990, Gel electrophoresis of proteins-A practical Approach, 2nd edn., IRL Press, Oxford
69. Durlu, Ö.F., Xanthopoulos, V., Tunail, N., Litopoulou, T.E., 2001, Technologically important properties of lactic acid bacteria isolates from Beyaz cheese made from ewe milk, *Journal of Applied Microbiology*. 91 (5), 861-870
70. Dicks, L.M.T., van Vuuren, H.J.J., 1987, Relatedness of heterofermentative *Lactobacillus* species revealed by numerical analysis of total soluble cell protein patterns, *Int. Journal of Systematic Bacteriology*. 37 (4), 437-440
71. Buchanan, R.E., Gibbons, N.E., 1974, *Bergey's manual of determinative bacteriology* . 8th Ed., The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 490-593s
72. Tamime, A.Y., Robinson, R.K., 1989, *Yoghurt : Science and Technology*. Pergamon Press, Oxford, p 431.
73. Kosikowski, F., 1982, *Cheese and Fermented Milk Foods*, Edwards Brothers, Inc., Ann Arbor, Michigan.

74. Yaygın, H., 1999, Yoğurt Teknolojisi, Akdeniz Ü.Z.F. yayınları, Antalya, 331s.
75. Konar, A., 1995, Yoğurda işlenecek sütün ısıtılması ve kaliteli yoğurt üretiminde uygulanabilecek sıcaklık ve sürenin belirlenmesi. Yoğurt, 3. Milli Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu, Milli Produktivite Merkezi yayınları , no:58, Ankara
76. Rasic, J., Kurman, D.A., 1978, Yoghurt :Technical Dairy Publishing House , 39, DK-2720 Vanise, Copenhagen, Denmark
77. Barrantes, E., Tamime, A.Y., Sword, A.M., 1994, Production of low colorie yogurt using skim milk powder and fat substitue, Milchwissenschaft. 49 (5), 263-266.
78. Robinson, R.K., Tamime, A.Y., 1976, J.Soc. Dairy Technol., 29, 48.
79. Kneifel, W., Ulberth, F., Erhard, F., Jaros, D., 1992, Aroma profiles an sensoryproperties of yogurt and yogurt products. I. Screening of commercially avaiable starter cultures, Milchwissenschaft - Milk Science International, 47, 6, p 362-365.
80. Atamer, M., Öner, Z., Çavuş, A., 1989, Chr. Hansen yoğurt kültürlerinden yararlanılarak üretilen set-tipi yoğurtların bazı kalite ölçütlerinin karşılaştırılması, Gıda. 14 (2), 99-103
81. Yaygın, H., Kılıç, S., 1993, Süt Endüstrisinde Saf Kültür, Altındağ Matbaacılık, İzmir, 105s.
82. Beyatlı, Y.A.H., 1982, Yoğurtlardan izole edilen kimi bakterilerin starter olarak seçilme olanakları, Doktora Tezi, A.Ü.Z.F., Ankara
83. Yaygın, H., 1980, Yoğurtlardan izole edilen *Lactabacillus bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* bakterilerinin özellikleri ve saf kültür halinde üretilmesi üzerinde araştırmalar, Doğa, 4, 122-127