

Laktokoklarda Endüstriyel Açından Önem Taşıyan Özelliklerin Genetik Determinantları

Mustafa AKÇELİK

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

Pınar ŞANLIBABA

Ankara Üniversitesi, Kalecik Meslek Yüksek Okulu, Ankara - TÜRKİYE

Çağla TÜKEL

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

Yasin TUNCER

Süleyman Demirel Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Isparta - TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 10.10.2000

Özet: *L. lactis* subsp. *lactis* MPL114, *L. lactis* subsp. *cremoris* MPC112 ve *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetyllactis* MPD166 suşlarında laktoz fermentasyonu, proteolitik aktivite ve bakteriyosin üretiminin genetik determinantları araştırıldı. Mutasyon ve genetik aktarım çalışmaları sonucu, *L. lactis* subsp. *cremoris* MPC112 suşunda her üç özelliğin de 65.4 kb büyüklükte bir plazmid tarafından kodlandığı belirlendi. *L. lactis* subsp. *lactis* MPL114 suşunda 68.0 kb büyüklükteki plazmidin laktoz fermentasyonu ve proteolitik aktivite özelliklerini, 12.4 kb büyüklükteki plazmidin ise bakteriyosin üretimi özelliğini kodladığı saptandı. *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetyllactis* MPD116 suşunda ise 61.0 kb'lık plazmid laktoz fermentasyonu, 14.2 kb'lık plazmid proteolitik aktivite ve 9.0 kb'lık plazmid bakteriyosin üretiminden sorumlu bulundu.

Anahtar Sözcükler: Laktokoklar, laktoz fermentasyonu, proteolitik aktivite, bakteriyosin üretimi, plazmid

Genetic Determinants of Industrially Important Characters in Lactococci

Abstract: Genetic determinants of lactose fermentation, proteolytic activity and bacteriocin production in the strains *L. lactis* subsp. *lactis* MPL114, *L. lactis* subsp. *cremoris* MPC112 and *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetyllactis* MPD166 were studied. As a result of mutation and genetic transfer studies, it was determined that all of these characters were encoded by the 65.4 kb plasmid in *L. lactis* subsp. *cremoris* MPC112. Lactose fermentation and proteolytic activity were encoded by the 68.0 kb plasmid and bacteriocin production was encoded by the 12.4 kb plasmid in *L. lactis* subsp. *lactis* MPL114. Lactose fermentation, proteolytic activity and bacteriocin production in *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetyllactis* MPD166 strain were found to be responsible for the 61.0 kb, 14.2 and 9.0 kb plasmids respectively.

Key Words: Lactococci, lactose fermentation, proteolytic activity, bacteriocin production, plasmid

Giriş

Laktokoklar (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris* ve *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetyllactis*); laktozu fermente ederek laktik asit oluşturma, kazein hidrolizi (proteolitik aktivite) ve bakteriyosin üretimi başta olmak üzere, üretim teknolojisi ve ürün tipine bağlı diğer biyokimyasal özellikleri de saptanmak suretiyle, starter kültür suşları olarak tanımlanmakta ve fermente süt endüstrisinde kullanılmaktadır (1, 2, 3, 4). Laktokoklarda laktoz

fermentasyonunun ana ürünü olan laktik asit, fermente süt ürünlerinin yapısal ve aromatik özelliklerinin oluşturulması yanında, patojenik ve bozulma etmeni mikroorganizmalara karşı da koruyucu rol oynamaktadır (5, 6). Diğer yandan bu bakteriler, içerdikleri proteinaz enzim sistemleri ile kazeini parçalayarak gelişmeleri için zorunlu ya da gelişmelerini teşvik eden amino asitleri oluşturmaktadır (7). Ayrıca, kazein hidroliz ürünlerinin peynirlerde tat ve aromanın oluşumunda rol oynadığı saptanmıştır (8).

Laktokokların ürettiği bakteriyosinler, etki mekanizmaları ve biyokimyasal özellikleri esas alınarak beş grup altında toplanmaktadır. Bunlar; diplokoksiner, laktokoksinler, laktokokkal porasyon kompleksleri, laktotrepisinler ve lantibiyotiklerdir (9). Genellikle dar bir etki spektrumuna sahip olan bu gruplar içerisinde, özellikle asitli gıdaların korunmasında, lantibiyotikler grubu üyesi nisin yaygın bir kullanım alanı bulmaktadır (10). Nisinin, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Listeria* ve *Bacillus* gibi önemli gıda bozulma etmeni ve patojen mikroorganizmaların gelişimini engellediği saptanmıştır (11).

Bu çalışmada, *Lactococcus* cinsine ait iki alt tür ve bir biyovaryetede laktoz metabolizması, proteolitik aktivite ve bakteriyosin üretiminin genetik determinantlarının saptanması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Materyal

Araştırmada kullanılan bakteriler Tablo 1'de verilmiştir. *Lactococcus* suşları M17 ortamında (12) geliştirilmiştir. Laktoz fermentasyon yeteneğini kaybetmiş (Lac^-) mutantlar için, bu ortama laktoz yerine glukoz ilave edilmiştir. *Leuconostoc carnosum* ve *Lactobacillus plantarum* MRS broth'ta (13), *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* ve *Listeria monocytogenes* standart Nutrient broth'ta (Merck, Darmstadt, Germany) geliştirilmiştir.

Bakteri kültür stokları, % 40 oranında gliserol içeren sıvı besin ortamlarında ve $-4^\circ C$ 'ta saklanmıştır.

Metot

Mutantların Seçimi ve Plazmid İzolasyonu

Plazmid giderme çalışmalarında mutajen ajan olarak akriflavin (Sigma Chem. Co., USA) kullanılmıştır. Laktokok suşlarının laktoz fermentasyonu ve proteolitik aktivite özelliklerindeki değişimler Fast-Slow Differential Agar (14) ortamında belirlenmiştir. Laktoz fermentasyonu ve proteolitik aktivite yeteneğini (Lac^+ ve Prt^+) sürdüren koloniler; 2-3 mm çapında, beyaz, konkav morfolojik yapıda ve koloni çevresinde kırmızı zon oluşumu ile tanımlanmıştır. Laktoz fermentasyonu ve proteolitik aktivite yeteneğini kaybetmiş (Lac^- ve Prt^-) koloniler ise; düz, yarı şeffaf, çapları 1 mm den küçük olmaları ve presipitasyon zonu oluşturmamaları esasına göre seçilmiştir. Bu kolonilerin bakteriyosin üretimleri agar diffüzyon yöntemi (15) ile belirlenmiştir.

Plazmid DNA izolasyonunda Anderson ve McKay (16) tarafından önerilen alkali denatürasyon yöntemi kullanılmış ve DNA örnekleri sezyum klorür-etidyum bromit ($CsCl-EtBr$) yoğunluk gradienti ile saflaştırılmıştır (17). Plazmid büyüklüklerinin saptanmasında cccDNA marker moleküllerinden (BRL, Product No: 5622SA, USA) yararlanılmıştır.

Bakteriyosin Biyodenemeleri

Bakteriyosin üretimi (Bac^+) ve bakteriyosin dirençlilik (Imm^+) testlerinde, agar diffüzyon yöntemi kullanılmıştır. Spesifik bakteriyosin aktivitesi (AU/ml), indikatör mikroorganizmaya karşı berrak zon veren en yüksek dilüsyon oranının 100 ile çarpımı sonucu elde edilmiştir. Bakteriyosinlerin kısmi saflaştırılmasında amonyum sülfat presipitasyon yönteminden yararlanılmıştır (18).

Bakteriyosin aktivitesi üzerine pH'nın etkisini belirlemek amacı ile, hücrelerden arındırılmış kültür sıvılarının pH'sı, 6 N NaOH ya da HCl kullanılmak suretiyle, 2-11 arasında 10 farklı düzeyde ayarlanmıştır. Örnekler $4^\circ C$ 'ta 24 saat tutulduktan sonra, indikatör mikroorganizmaya karşı aktiviteleri belirlenmiştir. Bakteriyosin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi ise, nötralize edilmiş kültür sıvılarının $100^\circ C$ de 5, 10, 15 ve 20 dk sürelerle inkübe edilmesinden sonra saptanmıştır. Nötralize edilmiş kültür sıvıları aynı zamanda; tripsin (pH 7.0), α -kemotripsin (pH 7.0), proteinaz K (pH 7.0), pepsin (pH 3.0), α -amilaz (pH 7.0), lipaz (pH 7.0), katalaz (pH 7.0) ve lizozim (pH 7.0) ile $37^\circ C$ de 2 saat inkübe edilmiş ve bu süre bitiminde reaksiyon, deney ortamlarının $100^\circ C$ 'ta 5 dk tutulması sonucu durdurulmuştur. Enzim uygulamayan örnekler kontrol olarak kullanılmıştır (19).

Sıcaklık ve enzim uygulamasından sonra kültür sıvılarında kalan bakteriyosin aktivitesi, *L. lactis* subsp. *cremoris* LC5 indikatör suşuna karşı kritik dilüsyon yöntemi (15) ile belirlenmiştir.

Sonuçlar ve Tartışma

L. lactis suşlarında laktoz fermentasyonu (Lac^+), proteolitik aktivite (Prt^+) ve bakteriyosin üretimi (Bac^+) özelliklerini kodlayan genetik determinantların belirlenmesinde; akriflavin uygulamasından sonra Fast-Slow Differential Agar ortamlarında Lac^+ , Prt^+ ; Lac^- , Prt^- ; Lac^+ , Prt^+ ve Lac^- , Prt^- fenotipler esas alınarak seçilen ve agar diffüzyon yöntemi ile indikatör bakteriye karşı (*L.*

Tablo1. Araştırmada kullanılan bakteriler

Bakteriler	Özellik	Kaynak ya da Referans
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MPL114	Lac ⁺ , Prt ⁺ , Bac ⁺	(20)
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> MPC112	Lac ⁺ , Prt ⁺ , Bac ⁺	(20)
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> MPD166	Lac ⁺ , Prt ⁺ , Bac ⁺	(20)
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC7962	Nisin üretici suş	W. M. de Vos ^a
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> LC5	Nisin ve bakteriyosin duyarlı indikatör suş	(21)
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> LC13	Nisin ve bakteriyosin duyarlı indikatör suş	(21)
<i>Micrococcus luteus</i> NCIMB8166	Nisin duyarlı indikatör suş	J. Erdeğer ^b
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC2046	Nisin duyarlı indikatör suş	C. Gürakan ^c
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538	Nisin duyarlı indikatör suş	(21)
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC15313	Nisin duyarlı indikatör suş	(21)
<i>Leuconostoc carnosum</i> DSM5576	Nisin duyarlı indikatör suş	(21)

Lac⁺: Laktoz fermentasyonu özelliği

Prt⁺ : Proteolitik aktivite

Bac⁺: Bakteriyosin üretim özelliği

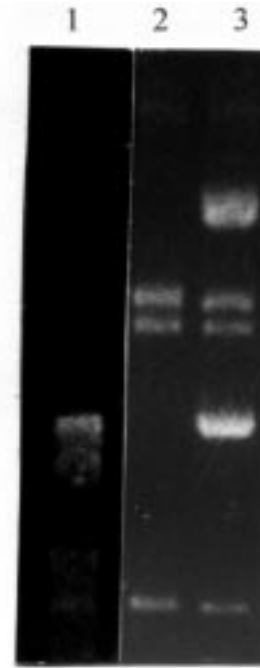
^a : NIZO, The Netherlands

^b : Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi

^c : ODTÜ Gıda Mühendisliği Bölümü

lactis subsp. *cremoris* LC5) bakteriyosin üretim özellikleri tanımlanan (Bac⁺ ya da Bac⁻) kolonilerin plazmid profillerinden yararlanılmıştır. Bu denemelerde, belirli bir plazmid veya plazmidlerin varlığında ya da yokluğunda laktoz fermentasyonu, proteolitik aktivite ve bakteriyosin üretim özellikleri değişen mutantlar esas alınmıştır (Şekil 1, 2 ve 3).

Mutant seçme ve seçilen mutantlara ait plazmid profillerinin, doğal suşların plazmid içerikleri ile karşılaştırılması sonucu; *L. lactis* subsp. *cremoris* MPC112 suşundan sadece 65.4 kb büyüklükteki plazmidin kaybının, Lac⁻, Prt⁻ ve Bac⁻ fenotipin oluşumuna yol açtığı saptanmıştır (Şekil 1). *L. lactis* subsp. *lactis* MPL114 suşunda ise, sadece 68.0 kb büyüklükteki plazmidi içeren mutantın (MPL114-11) Lac⁺ ve Prt⁺ ancak Bac⁻ fenotipik özellik gösterdiği, diğer yandan doğal suştan yalnız 12.4 kb büyüklükteki plazmidi içermemesi ile ayrılan MPL114-8 mutantının da Lac⁺, Prt⁺, Bac⁻ özellikte olduğu saptanmıştır (Şekil 2). Son olarak, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* MPD166 suşunda yalnız 61.0 kb plazmidi içeren mutantın (MPD166-2) Lac⁺, Prt⁺ ve Bac⁻, 26.3 kb ve 22.1 kb plazmidleri kaybetmiş mutantın (MPD166-20) Lac⁺, Prt⁺, Bac⁺, yalnız 50.8 kb plazmidi içeren mutantın (MPD166-71) Lac⁺, Prt⁻, Bac⁻, 26.3 kb ve 14.2 kb plazmidleri içeren mutantın (MPD166-42) Lac⁺, Prt⁺, Bac⁻ ve 50.8 kb, 14.2



Şekil 1. *L. lactis* subsp. *cremoris* MPC112 suşu ve mutantlarının plazmid içerikleri

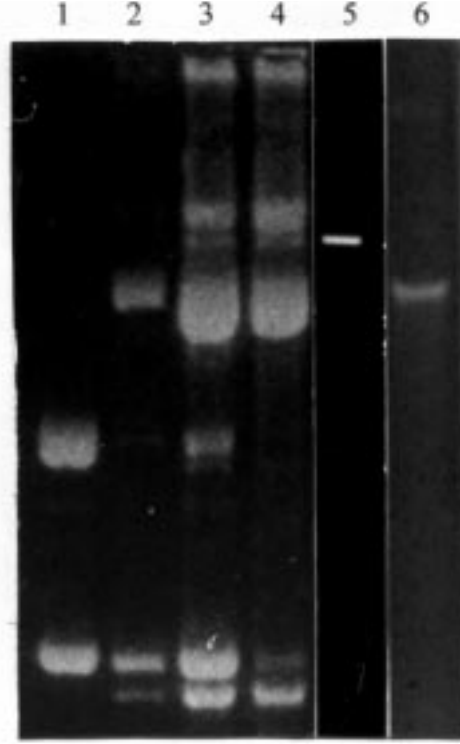
- 1: MPC112-33 (Lac⁻, Prt⁻, Bac⁻): 29.1 kb
 2: MPC112-3 (Lac⁻, Prt⁻, Bac⁻): 48.2, 44.6 ve 6.4 kb
 3: MPC112 (Lac⁺, Prt⁺, Bac⁺, doğal suş): 65.4, 48.2, 44.6, 29.1 ve 6.4 kb



Şekil 2. *L. lactis* subsp. *lactis* MPL114 suşu ve mutantlarının plazmid içerikleri

- 1: MPL114-11(Lac⁺, Prt⁺, Bac⁻): 68.0 kb
 2: MPL114-8 (Lac⁺, Prt⁺, Bac⁻): 68.0, 65.4, 60.0 ve 10.8 kb
 3: MPL114 (Lac⁺, Prt⁺, Bac⁺, doğal suş): 68.0, 65.4, 60.0, 12.4 ve 10.8 kb

kb ve 9.0 kb plazmidleri içeren mutantın (MPD166-7) Lac⁻, Prt⁺ ve Bac⁺ özellikler içerdiği saptanmıştır (Şekil 3). Bu sonuçlar; *L. lactis* subsp. *cremoris* MPC112 suşunda her üç özelliğin de 65.4 kb, *L. lactis* MPL114 suşunda laktoz fermentasyonu ve proteolitik aktivite özelliklerinin 68.0 kb, bakteriyosin üretim özelliğinin ise 12.4 kb ve *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* MPD166 suşunda laktoz fermentasyonunun 61.0 kb, proteolitik aktivite özelliğinin 14.2 kb ve bakteriyosin üretiminin 9.0 kb büyüklükteki plazmidler tarafından kodlandığına işaret etmektedir. Laktokoklarda laktoz fermentasyonu, proteolitik aktivite, faj dirençlilik ve bakteriyosin üretimi gibi endüstriyel açıdan önem taşıyan özelliklerin, değişik kombinasyonlarda olmak üzere aynı genetik determinantlar tarafından kodlandığı belirlenmiştir.



Şekil 3. *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* MPD166 suşu ve mutantlarının plazmid içerikleri

- 1: MPD166-42 (Lac⁻, Prt⁺, Bac⁻): 26.3 ve 14.2 kb
 2: MPD166-7 (Lac⁻, Prt⁺, Bac⁺): 50.8, 14.2 ve 9.0 kb
 3: MPD166 (Lac⁺, Prt⁺, Bac⁺, doğal suş): 66.0, 61.0, 52.6, 50.8, 44.4, 26.3, 22.1, 14.2 ve 9.0 kb
 4: MPD166-20 (Lac⁺, Prt⁺, Bac⁺): 66.0, 61.0, 52.6, 50.8, 44.4, 14.2 ve 9.0 kb
 5: MPD166-2 (Lac⁻, Prt⁺, Bac⁻): 61.0 kb
 6: MPD166-71 (Lac⁻, Prt⁻, Bac⁻): 50.8 kb

Ancak bu suşlarda laktoz fermentasyonu ve proteolitik aktivite özelliklerinin gen kodu genellikle farklı plazmidler üzerinde taşınmaktadır (21, 22, 23, 24, 25).

L. lactis suşlarının ürettiği bakteriyosinlerin karakteristikleri, *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC7962 suşunun ürettiği nisin ile karşılaştırmak suretiyle tanımlanmıştır. *L. lactis* subsp. *lactis* MPL114 ve *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* MPD166 suşlarının ürettiği bakteriyosin sadece *L. lactis* subsp. *cremoris* suşlarına karşı inhibitör etki gösterirken, *L. lactis* subsp. *cremoris* MPC112 suşunun ürettiği bakteriyosin, tıpkı nisin gibi, denenen tüm bakterilere karşı etkili bulunmuştur (Tablo 2). MPL114 ve MPD 166 suşlarının kısmi saflaştırılmış bakteriyosinlerinin *L. lactis* subsp. *cremoris* LC5 suşuna karşı inhibitör etkisi; tripsin, a-

kemotripsin, proteinaz K ve pepsin uygulaması sonucu tamamen kaybolurken, MPD166 bakteriyosini, yine nisin kontrolü ile paralel bir şekilde, α -kemotripsin ve proteinaz K muamelesi sonucunda inhibitör etkisini kaybetmiştir. Tüm suşların ürettiği bakteriyosinler ısı stabil özellik göstermiştir (Tablo 3). MPL114 ve MPD166 suşları bakteriyosinleri pH 2 ve pH 3'de hiçbir inhibitör etki göstermezken, en yüksek inhibisyon etkisi pH 7-pH 8'de belirlenmiştir. pH 9 ve üzerinde inhibitör etki, her iki bakteriyosinde de azalmaya başlamıştır. MPC112 bakteriyosini ve nisin pH 2, pH 3 ve pH 4'de maksimum

etki göstermiştir. pH 5 ve üzerinde *L. lactis* subsp. *cremoris* LC5 suşuna karşı inhibitör etki azalmaya başlamış ve pH 7'de bu etki nisin için % 89.0, MPD166 bakteriyosini için ise % 87.12 oranında düşmüştür (Tablo 4).

Bu bulgular, MPL114 ve MPD166 suşlarının; tür içi etki spektrumuna sahip, ısı stabil ve protein alt üniteleri içeren bakteriyosinler ürettiğine işaret etmektedir. Yukarıda tanımlanan özellikler laktokoksinlerin genel karakteristikleri ile uyum göstermektedir (26, 27, 28). MPD166 suşunun ürettiği bakteriyosinin; ATCC7962 suşu tarafından üretilen nisin ile aynı biyolojik aktiviteye

Tablo 2. *L. lactis* suşları ve nisin üretici kontrol suş *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC7962 suşunun hücreden arındırılmış ve nötralize edilmiş kültür sıvılarının (CFNS) bakteri inhibisyon spektrumu

İndikatör Suşlar	CFNS ^a			
	MPL114	MPC112	MPD166	ATCC7962
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> LC5	+	+	+	+
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> LC13	+	+	+	+
<i>Leuconostoc carnosum</i> DSM5576	-	+	-	+
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC2046	-	+	-	+
<i>Micrococcus luteus</i> NCIMB8166	-	+	-	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538	-	+	-	+
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC15313	-	+	-	+

^a : Hücrelerden arındırılmış kültür sıvıları, 6N NaOH kullanılmak suretiyle pH 6.5-7.0 düzeyine ayarlanmış ve 100°C'ta 5 dk ısıtıldıktan sonra kullanılmıştır.

- : İnhibitör etki yok.

+ : İnhibitör etki var.

Tablo 3. *L. lactis* suşlarının ürettiği bakteriyosinlerin aktivitesi üzerine enzimler ve sıcaklığın etkisi

Uygulama	Bakteriyosin Aktivitesi (AU/mL)			
	MPL114	MPC112	MPD166	ATCC7962
Kontrol	8200	12400	6600	10200
Tripsin (Sigma, No. T8658)	0	13600	0	12800
α -Kemotripsin (Sigma, No. C-6423)	0	0	0	0
Proteinaz K (Sigma, No. C-0390)	0	0	0	0
Pepsin (Merck, No. 7147)	0	18800	0	16400
α -Amilaz (Sigma, Tip VIIA)	8000	14200	6200	13400
Katalaz (Sigma, No. C-10)	7200	14200	5400	13400
Lizozim (Sigma, No. 7651)	7200	14200	5400	13400
Lipaz (Sigma, No. L1714)	7200	14200	5400	13400
100°C – 5 dk	7200	14200	5400	13400
100°C – 10 dk	7200	14200	5400	13400
100°C – 15 dk	7200	14200	5400	13400
100°C – 20 dk	2400	2400	1200	4800

Tablo 4. *L. lactis* suşlarının ürettiği bakteriyosinlerin aktivitesi üzerine pH'ın etkisi

pH	Bakteriyosin Aktivitesi (AU/mL)			
	MPL114	MPC112	MPD166	ATCC7962
2	0	32600	0	30800
3	0	32600	0	30800
4	1800	32600	800	30800
5	3200	28400	2400	26600
6	7400	16200	5800	13200
7	8200	4200	6600	2800
8	8200	2200	6600	800
9	6400	2200	4600	800
10	2400	1800	1200	800
11	1600	200	600	200

Kaynaklar

- Teuber, M. Strategies for Genetic Modification in Lactic Acid Bacteria. *Food Biotechnol.*, 4; 537-546, 1990.
- Gauthier, K. G., Gratadoux, J. J., Richard, J. Conjugal Plasmid Transfer Between Lactococci on Solid Surface Matings and During Cheese Making. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 85; 133-140, 1991.
- Renault, P. Progress in Genetic Research of Lactic Acid Bacteria. *Curr. Adv. Gen.*, 10; 15-37, 1996.
- Hellinck, S., Richard, J., Julliard, F. The Effects of Adding Lactococcal Proteinase on the Growth Rate of *Lactococcus lactis* in Milk Depend on Type of Enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63; 2124-2130, 1997.
- De Vos, W. M. Gene Cloning and Expression in Lactic Streptococci. *FEMS Microbiol. Rev.*, 46; 281-295, 1987.
- Tükel, Ç., Akçelik, M. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Suşlarında Laktoz Plazmidlerinin Tanımlanması. *Tr. J. of Biology*, 24; 405-424, 2000.
- Reid, J., Coolbear, T., Pillidge, C. J., Pritchard, G. G. Specificity of Hydrolysis of Bovine-K-Casein by Cell-Envelope Associated Proteinases from *Lactococcus lactis* Strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60; 801-806, 1994.
- Gilbert, C., Blanc, B., Frot-Coutaz, J., Portalier, R., Atlan, D. Comparison of Cell Surface Proteinase Activities within the *Lactobacillus* Genus. *J. Dairy Res.*, 64; 561-571, 1997.
- Klaenhammer, T. R. Genetics of Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 12; 39-86, 1993.
- Entian, K. D., Engelke, G., Eckel, G., Kiesau, P., Siegers, K., Hammelman, M. Regulation of Nisin Biosynthesis and Immunity in *Lactococcus lactis* GF3. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60; 815-825, 1994.
- Broughton, J. P., Blackburn, P., Evans, R. J., Hugenholtz, J. Application of Bacteriocin Nisin. *Antonie van Leeuwen.*, 1/2; 193-202, 1996.
- Terzaghi, B. E., Sandine, W.E. Improved Medium for Lactic Streptococci and Their Bacteriophages. *Appl. Microbiol.*, 29; 807-813, 1975.
- de Man, J. C., Rogosa, M., Sharpe, M. E. A Medium for the Cultivation of Lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.*, 23; 130-135, 1960.
- Huggins, A. R., Sandine, W. E. Differentiation of Fast and Slow Milk Coagulating Isolates in Strains of Lactic Streptococci. *J. Dairy Sci.*, 67; 1675-1679, 1984.
- Dufour, A., Thault, D., Boilliou, A., Bourges, C. M., Le Penec, J. P. Plasmid Determinants for Bacteriocin Production and Immunity in a *Lactococcus lactis* Strain and Purification of the Inhibitory Peptide. *J. Gen. Microbiol.*, 137; 2423-2429, 1991.
- Anderson, D. G., McKay, L. L. Simple and Rapid Method for Isolating Large Plasmid DNA from Lactic Streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.*, 46; 549-552, 1983
- 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.
- Geis, A., Singh, J., Teuber, M. Potential of Lactic Streptococci to Produce Bacteriocin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 45; 205-211, 1983.
- Franz, C. M. A. P., Du Toit, A., von Holy, U., Holzapfel, W. H. Production of Nisin-Like Bacteriocins by *Lactococcus lactis* Strains Isolated from Vegetables. *J. Basic Microbiol.*, 37; 187-196, 1997.
- Akçelik, M., Şanlıbaba, P., Tükel, Ç. Phage Resistance in *L. lactis* subsp. *lactis* Isolated from Traditional Fermented Milk Products in Turkey. *Int. J. Food Sci. Technol.*, In Press, 2000.
- Akçelik, M. The Conjugal Plasmid pLL10236 Encodes Lactose Fermentation Ability, Restriction/Modification Activity, Bacteriocin Production and Immunity in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LL102. *Food Microbiol.*, 16; 487-494, 1999.
- Powell, I. B., Ward, A. C., Hillier, A. J., Davidson, B. E. Simultaneous Conjugal Transfer in *Lactococcus* Genes Involved in Bacteriocin Production and Reduced Susceptibility to Bacteriophages. *FEMS Microbiol. Lett.*, 72; 209-214, 1990.
- Powell, I. B., Romano, G. M., Hillier, A. J., Davidson, B. E. Genetic Enhancement of Phage Resistance in a Commercial Cheese Starter. *Aust. J. Dairy Technol.*, 49; 30-33, 1994.

sahip olması ve pH, sıcaklık ve enzim muamelesine karşı da benzer davranışı göstermesi, bu inhibitör materyalin nisin olduğunun güçlü delilleridir. Zira pH 2-3 civarında optimum aktivite gösteren ve tür dışı inhibitör etkiye sahip yegane laktokokkal bakteriyosin, nisin'dir (29, 30).

Araştırmada kullanılan suşlar içerisinde *L. lactis* subsp. *cremoris* MPC112; gerek tanımlanan her üç metabolik özelliğinin de tek bir plazmid tarafından kodlanması ve gerekse geniş bir antimikrobiyel spektrumuna sahip bir inhibitör madde üretmesi özellikleri ile, endüstriyel starter kültür suşları geliştirme çalışmaları için ideal bir konakçı kapasitesi göstermektedir.

24. Coakley, M., Fitzgerald, G. F., Ross, R. P. Application and Evaluation of the Phage Resistance and Bacteriocin Encoding Plasmid pMRCO1 for the Improvement of Dairy Starter Cultures. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63;1434-1440, 1997.
25. Akçelik, M. Plasmid Mediated Industrial Traits in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LL140. *Milchwissenschaft*, 54: 603-606, 1999.
26. Geis, A., Singh, J., Teuber, M. Potential of Lactic Streptococci to Produce Bacteriocin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 45;205-211, 1985.
27. Zajdel, J. K., Ceglowski, P., Dobrzanski, W. T. Mechanism of Action of Lactosetrepsin 5, a Bacteriocin Produced by *Streptococcus cremoris* 202. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49; 969-974, 1985.
28. Kojik, M., Svircevic, A. B., Topirisoric, L. Bacteriocin Producing Strain of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* S50. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57; 1835-1837,1991.
29. Piard, J. C., Kuipers, O. P., Rolema, H. S., Desmazeud, M. J., de Vos, W. M. Structure, Organization and Expression of the Gene for Lacticin 481 a Novel Lantibiotic Produced by *Lactococcus lactis*. *J. Biol. Chem.*, 268; 16361-16368,1993.
30. Kok, J. Inducible Gene Expression and Environmentally Regulated Genes in Lactic Acid Bacteria. *Antonie van Leeuwen.*, 70; 129-145, 1996.